

Request Form for Translation

PTO 2001-3941

U. S. Serial No. : 09/435274

S.T.I.C. Translations Branch

Requester's Name: Katharine Davis

Phone No. : 605-1195

Fax No. : 746-5199

Office Location: Crystal Mall one 11A16

Art Unit/Org. : 1636

Group Director: John Dou

Is this for Board of Patent Appeals? NO

Date of Request: 8-13-01

Date Needed By: 9-13-01

Please do not write ASAP-indicate a specific date)

Equivalent
Searching

Foreign Patents

Phone: 308-0881
Fax: 308-0989
Location: Crystal Plaza 3/4
Room 2C01

SPE Signature Required for RUSH:

Document Identification (Select One):

**** (Note: Please attach a complete, legible copy of the document to be translated to this form) ****

1. ☒ Patent Document No. WO 98/49284
Language Japanese
Country Code JP
Publication Date 11-5-98
No. of Pages _____ (filled by STIC)

2. _____ Author _____
Language _____
Country _____

3. _____ Type of Document _____
Country _____
Language _____

Document Delivery (Select Preference):

_____ Delivery to nearest EIC/Office Date: 9-11-01 (STIC Only)

_____ Call for Pick-up Date: _____ (STIC Only)

☒ Fax Back Date: _____ (STIC Only)

To assist us in providing the most cost effective service, please answer these questions:

Will you accept an English Language Equivalent?

_____ (Yes/No)

Will you accept an English abstract?

_____ (Yes/No)

Would you like a consultation with a translator to review the document prior to having a complete written translation?

_____ (Yes/No)

STIC USE ONLY

Copy/Search

Processor: MVA
Date assigned: 8/14
Date filled: 8/16
Equivalent found: _____ (Yes/No)

Doc. No.: _____
Country: _____

Remarks: _____

Translation

Date logged in: 8/14
PTO estimated words: 16830
Number of pages: 47
In-House Translation Available: _____

In-House:

Translator: _____
Assigned: _____
Returned: _____

Contractor:

Name: SC
Priority: 8.16.01
Sent: 8.16.01
Returned: 9-10-01



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/09, C12Q 1/68</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/49284</p> <p>(43) 国際公開日 1998年11月5日(05.11.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/01936</p> <p>(22) 国際出願日 1998年4月27日(27.04.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/124795 1997年4月28日(28.04.97) JP 特願平9/309686 1997年10月24日(24.10.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ヘリックス研究所 (HELIX RESEARCH INSTITUTE)[JP/JP] 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番地3 Chiba, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 植本信秀(UEKI, Nobuhide)[JP/JP] 〒194-0003 東京都町田市小川2-12-3 町田コープタウン5-404 Tokyo, (JP) 野口照久(NOGUCHI, Teruhisa)[JP/JP] 〒251-0037 神奈川県藤沢市鵠沼海岸2-8-11 Kanagawa, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: METHODS FOR DETECTING AND ISOLATING NUCLEAR TRANSPORT PROTEINS</p> <p>(54)発明の名称 核移行タンパク質の検出および単離方法</p> <p>(57) Abstract A method for conveniently detecting whether or not a DNA to be tested encodes a peptide with nuclear transportability, which comprises transferring, into an eukaryotic host having in its nucleus a promoter region activated when a transcription factor binds thereto and a reporter gene whose expression is induced by the promoter region, a DNA obtained by fusing a DNA encoding the above-mentioned transcription factor from which the nuclear transportability has been eliminated with the DNA to be tested and then detecting the expression of the reporter gene; and a method for completely and efficiently isolating a DNA encoding a peptide having the nuclear transportability, which comprises isolating the DNA to be tested from the cells showing the expression of the reporter gene.</p> <p style="text-align: center;">PTO 2001-3941 S.T.I.C. Translations Branch</p>		

(57)要約

転写因子が結合した際に活性化されるプロモーター領域および該プロモーター領域により発現が誘導されるレポーター遺伝子を核内に保持する真核生物宿主に対し、核移行能を除去した該特定の転写因子をコードするDNAと被検DNAとの融合DNAを導入し、該レポーター遺伝子の発現を検出することにより、被検DNAが核移行能を有するペプチドをコードしているか否かを簡便に検出することが可能であることを見出した。さらに、レポーター遺伝子の発現が検出された細胞から被検DNAを単離することにより、高効率で網羅的に核移行能を有するペプチドをコードするDNAを単離することが可能であることを見出した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	US	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CH	スイス	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェッコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア		

明細書

核移行タンパク質の検出および単離方法

技術分野

本発明は、核移行タンパク質の検出および単離方法に関し、遺伝子工学の分野、特に遺伝子のクローニングなどの分野に属する。

背景技術

核内に移行するタンパク質としては、種々の転写因子、核内レセプター、シグナル伝達因子、クロマチンレセプターなどが知られている。これらのタンパク質は、細胞内のシグナル伝達カスケードの終端付近において直接的または間接的に特定のDNA領域と相互作用し、遺伝子の発現制御やDNAの複製などを行い、その結果、細胞の挙動が決定される。従って、これら核内に移行するタンパク質の遺伝子を単離し、その機能を解析することは、種々の生命現象の解明や新薬の開発という面から非常に重要な意味を持つと考えられる。

しかしながら、核内に移行するタンパク質をコードするのcDNAを網羅的にクローニングするための特別な方法は開発されておらず、これまではクローニング技術を応用した一般的な方法により行われていた。即ち、クローニングを試みるタンパク質に関して何らかの情報がある場合、例えば、アミノ酸レベルで保存された配列がある (Lichtsteiner, S., Proc. Natl. Acad. Sci., 1993, 90: 9673-9677)、相互作用するDNA配列が既に判明している (Sanz, L., Mol. Cell. Biol., 1995, 15: 3164-3170; CLONTECH社製, MATCHMAKER One-Hybrid System)、または相互作用するタンパク質が既に判明しているなどの場合に、この情報を基にcDNAライブラリーをスクリーニングする方法が行われていた。しかし、この場合にはスクリーニングは極めて限定された範囲でしか行うことができなかった。

例えば、相互作用するタンパク質を単離する方法として近年開発された「Two-Hybrid System」(Gyuris, J., *Cell*, 1993, 75: 791-803; Golemis, E. A., *Current Protocols in Molecular Biology* [John Wiley & Sons, Inc.], 1996, Ch. 20.0 and 20.1) は、既に核内に存在することが知られているタンパク質をベイト (Bait) として用いることにより、間接的に、該タンパク質と相互作用するタンパク質をコードするcDNAをスクリーニングすることは可能であるが (Jordan, K. L., *Biochemistry*, 1996, 35: 12320-12328)、直接的に、核内への移行活性を有するタンパク質をコードするcDNAのスクリーニングする方法としては使用できない。また、核内に存在することが知られているタンパク質をベイト (Bait) として用いた場合においても、細胞質内で相互作用して核内に移行したのか、実際に核内で相互作用したのか不明であるため、核タンパク質以外のタンパク質をコードするcDNAをも単離してしまう可能性が存在する。このため単離したcDNAが核へ移行するタンパク質をコードしているか否かにつき、労力を伴う確認作業が必須である。また、「Two-Hybrid System」はタンパク質間の相互作用を指標にしているため、スクリーニングで得られてくるものはベイト (Bait) に用いたタンパク質と相互作用する可能性のあるタンパク質のみに限定されてしまうという問題点も存在する。

一方、目的とするタンパク質に関して上記のような情報すら得られない場合には、細胞から核画分を抽出し、その中から目的のタンパク質を、そのタンパク質が有する特異的な生物活性などの機能を指標にする方法で精製し、得られたタンパク質の配列情報を基にcDNAライブラリーのスクリーニングを行う方法を探らざるを得なかった (Ostrowski, J., *J. Biol. Chem.*, 1994, 269: 17626-17634)。しかし、核内へ移行するタンパク質の中にはその発現レベルが非常に低いものが存在し、このようなタンパク質を精製するために多大な労力と時間が費やされることも多く、また実質上不可能に近い場合もあった。

発明の開示

本発明は、核移行能を有するペプチドをコードするDNAを簡便かつ効率的に検出し、単離する方法を提供することを課題とする。

核内へ移行するタンパク質の一つとして、転写因子が挙げられる。真核生物の転写因子は、核内へ移行して特定の遺伝子のプロモーター領域と相互作用することにより該特定の遺伝子の発現を誘導する機能を有しており、転写因子の核移行能は転写因子中に存在する核移行シグナルに起因していると考えられている。本発明者らは、核移行能および特定の遺伝子の転写活性化能を有するという転写因子の2つの特性に着目して上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、転写因子中の核移行能を有する領域を除去してその代わりに未知のペプチドが導入された融合タンパク質を細胞内で発現させた場合、該融合タンパク質中の未知のペプチドが核移行能を有すれば、融合タンパク質が核内へと移行して特異的なプロモーター領域と作用し、その下流の特定の遺伝子の発現が誘導されると考えた。一方、該融合タンパク質中の未知のペプチドが核移行能を有しなければ、融合タンパク質は核内へ移行せず、プロモーター領域下流の特定の遺伝子の発現は誘導されないと考えた。即ち、核移行能を有しない転写因子に未知のペプチドを融合したタンパク質による、特異的なプロモーター下流の遺伝子の発現の誘導を指標に、融合タンパク質中の未知のペプチドが核移行能を有するか否かの判定を行うことが可能であると考えた。

そこで本発明者らは、かかる考えに基づき、実際に、核移行能を有する領域を除去した転写因子をコードするDNAと被検DNAとの融合DNAを調製し、転写因子が結合した際に活性化されるプロモーター領域および該プロモーター領域の活性化により発現が誘導されるレポーター遺伝子を核内に保持している真核生物宿主に導入し、該レポーター遺伝子の発現の検出を行った。その結果、被検DNAとして核移行能を有するペプチドをコードしているDNAを用いた場合にはレポーター遺伝子の発現が誘導され、一方、被検DNAとして核移行能を有しないペプチドをコードして

いるDNAを用いた場合には、レポーター遺伝子の発現が誘導されないことを見出した。

また、本発明者らは、核移行能を有する領域を除去した転写因子と他のペプチドとの融合タンパク質をコードするcDNAのライブラリーを調製し、これを細胞内に導入してレポーターの発現を指標に核移行能を有するペプチドをコードするcDNAのスクリーニングを行った。その結果、cDNAライブラリーの中から単離されたcDNAのうち既知のcDNAの多くは核移行能を有すると考えられるタンパク質をコードしていることを見出した。

即ち、本発明は、転写因子の性質を利用して、核移行能を有するペプチドをコードするDNAを簡便かつ効率的に検出し、単離する方法に関し、より具体的には、

(1) 核移行能を有しない転写因子をコードするDNAと被検DNAとの融合DNAを、該転写因子が結合した際に活性化されるプロモーター領域および該プロモーター領域の下流に連結したレポーター遺伝子を核内に保持する真核生物宿主に導入し、該レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする、被検DNAがコードするペプチドの核移行能の検出方法、

(2) 核移行能を有しない転写因子が、核外移行シグナル、DNA結合ドメイン、および転写活性化ドメインを含む融合タンパク質である、(1)に記載の方法、

(3) 核移行能を有しない転写因子が、核外移行シグナル、LexAタンパク質、GAL4の転写活性化ドメインを含む融合タンパク質であり、該転写因子が結合した際に活性化されるプロモーター領域が、オペレーター配列をLexAのオペレーター配列に置換したGAL1遺伝子のプロモーター領域である、(1)に記載の方法、

(4) 核外移行シグナルが配列番号：5に記載のアミノ酸配列からなるペプチドである、(3)に記載の方法、

(5) レポーター遺伝子がLEU2および／または β -ガラクトシダーゼの遺伝子である、(1)～(4)のいずれかに記載の方法、

(6) 核移行能を有しない転写因子をコードするDNAと被検DNAとの融合DNAを、

該転写因子が結合した際に活性化されるプロモーター領域および該プロモーター領域の下流に連結したレポーター遺伝子を核内に保持する真核生物宿主に導入し、該レポーター遺伝子の発現を検出し、発現が検出された真核生物宿主から被検DNAを単離することを特徴とする、核移行能を有するペプチドをコードするDNAの単離方法、

(7) 核移行能を有しない転写因子が、核外移行シグナル、DNA結合ドメイン、および転写活性化ドメインを含む融合タンパク質である、(6)に記載の方法、

(8) 核移行能を有しない転写因子が、核外移行シグナル、LexAタンパク質、GAL4の転写活性化ドメインを含む融合タンパク質であり、該転写因子が結合した際に活性化されるプロモーター領域が、オペレーター配列をLexAのオペレーター配列に置換したGAL1遺伝子のプロモーター領域である、(6)に記載の方法、

(9) 核外移行シグナルが配列番号：5に記載のアミノ酸配列からなるペプチドである、(8)に記載の方法、

(10) レポーター遺伝子がLEU2および/または β -ガラクトシダーゼの遺伝子である、(6)～(9)のいずれかに記載の方法、

(11) 核移行能を有しない転写因子をコードするDNAに隣接した被検DNAの導入部位を有するベクター、

(12) 核移行能を有しない転写因子が、核外移行シグナル、DNA結合ドメイン、および転写活性化ドメインを含む融合タンパク質である、(11)に記載のベクター、

(13) 核移行能を有しない転写因子が、核外移行シグナル、LexAタンパク質、GAL4の転写活性化ドメインを含む融合タンパク質である、(11)に記載のベクター、

(14) 核外移行シグナルが配列番号：5に記載のアミノ酸配列からなるペプチドである、(13)に記載のベクター、

(15) ①核移行能を有しない転写因子をコードするDNAに隣接した被検DNAの

導入部位を有するベクター、②該転写因子が結合した際に活性化されるプロモーター領域と該プロモーター領域の下流に連結したレポーター遺伝子とからなる発現ユニットを核内に保持する真核生物宿主、を含むキット、

(16) 核移行能を有しない転写因子が、核外移行シグナル、DNA結合ドメイン、および転写活性化ドメインを含む融合タンパク質である、(15)に記載のキット、

(17) 核移行能を有しない転写因子が、核外移行シグナル、LexAタンパク質、GAL4の転写活性化ドメインを含む融合タンパク質であり、該転写因子が結合した際に活性化されるプロモーター領域が、オペレーター配列をLexAのオペレーター配列に置換したGAL1遺伝子のプロモーター領域であり、真核生物宿主が酵母である、(15)に記載のキット、

(18) 核外移行シグナルが配列番号：5に記載のアミノ酸配列からなるペプチドである、(17)に記載のキット、

(19) レポーター遺伝子がLEU2および／または β -ガラクトシダーゼの遺伝子である、(15)～(18)のいずれかに記載のキット、
に関する。

なお、本発明において「転写因子」とは、DNA結合ドメインと転写活性化ドメインを有し、特定の遺伝子の転写の活性化を行うタンパク質を指し、天然に存在するものであるか否かは問わない。また、本発明における「ペプチド」には、タンパク質の他、タンパク質の部分ペプチド、合成ペプチドなどが含まれる。

本発明は第一に、核移行能を有しない転写因子をコードするDNAと被検DNAとの融合DNAを、該転写因子が結合した際に活性化されるプロモーター領域および該プロモーター領域の活性化により発現が誘導されるレポーター遺伝子を核内に保持する真核生物宿主に導入し、該レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする、被検DNAがコードするペプチドの核移行能の検出方法に関する。

本発明において「核移行能を有しない転写因子」の調製に用いられる転写因子

としては、真核生物において遺伝子の発現制御を特異的に行うことができるものであれば特に制限はなく、例えば、GAL4 (Giniger, E., Cell, 1985, 40: 767-774)、p53 (Chumakov, P. M., Genetika, 1988, 24: 602-612)、GCN4 (Hinnenbusch, A. G., Proc. Natl. Acad. Sci., 1984, 81: 6442-6446)、VP16 (Triezenberg, S. J., Genes. Dev., 1988, 2: 718-729)、RelA (Nolan, G. P., Cell, 1991, 64: 961-969)、Oct-1 (Strum, R. A., Genes. Dev., 1988, 2: 1582-1599)、c-Myc (Watt, R., Nature, 1983, 303: 725-728)、c-Jun (Angel, P., Cell, 1988, 55: 875-885)、MyoD (Write, W. E., Cell, 1989, 56: 607-617)などを用いることが可能である。

本発明における「核移行能を有しない転写因子」としては、転写活性化能およびDNA結合能を有し、核移行能を有さない（または、核移行能が著しく低い）転写因子であれば、特に制限はない。例えば、核移行シグナルを除去または他のアミノ酸で置換した転写因子、DNA結合ドメインと転写活性化領域からなる融合タンパク質である転写因子などが挙げられる。

核孔には、特異的な能動輸送系以外に、拡散による低分子物質（分子量4万ダルトン以下）の物質移動があると一般的には考えられており、核移行シグナルを欠失、置換して転写因子の能動的な核移行能を除去しても、拡散による核内への物質移動が起こることがある。この場合には、さらに核以外の細胞内にタンパク質を局在させるシグナルを付加することにより、拡散による核内への物質移動を完全にあるいは最小限に抑制することが可能である。本発明の「核移行能を有しない転写因子」には、このように核以外の細胞内局在性シグナルを付加した転写因子も含まれる。核以外の細胞内局在性シグナルとしては、例えば、核外移行シグナル(Gorlich, D., Science, 1996, 271: 1513-1518)、分泌シグナル、ペルオキシソーム移行シグナル、粗面小胞体移行シグナル、ミトコンドリア移行シグナル(Nakai, K., Genomics, 1992, 14: 897-911; Nakai, K., PSORT WWW server, <http://psort.nibb.ac.jp/>)などが挙げられるが、これらに制限されない。

また、転写因子によっては、複数の核移行シグナルを有するものや、核移行能は認められるものの分子内における核移行シグナルの位置を完全に特定できないもの（GAL4、p53など（田中真人，Cell Science [日本語]，1991，7：265-272））が存在する。また、DNA結合ドメインまたは転写活性化ドメインと核移行シグナルが重複しており、核移行シグナルの欠失、置換を行うとDNA結合能あるいは転写活性化能までも失われる可能性があるものが存在する。このような転写因子を用いる場合には、核移行シグナル配列を完全に特定することが不可能であっても、核移行能を除去するために必要な領域を特定し、該領域につき欠失、置換などを行うことにより、核移行能を有しない転写調節因子を調製すればよい。また、核移行シグナルが存在しないことが既知である真核生物または原核生物由来のタンパク質のDNA結合ドメインと、核移行シグナルが存在しないことが既知である転写活性化ドメインとを融合させた人工的なハイブリッド転写因子を創成することによって調製することも可能である。本発明における「核移行能を有しない転写因子」には、このようにして調製された転写因子も含まれる。

本発明の核移行能を有しない転写因子を調製するために用いられる転写活性化ドメインとしては、これらに制限されないが、例えば、GAL4の転写活性化ドメイン（Brent, R., Cell, 1985, 43: 729-736）、Bicoid、c-Fos、c-Myc、v-Myc、B6、B7、B42（Golemis, A., E., Mol. Cell. Biol., 1992, 12: 3006-3014）、GCN4（Hope, I., A., Cell, 1986, 46: 885-894）、またはVP16（CLONTECH社，Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit）などが挙げられる。また、DNA結合ドメインとしては、これらに制限されないが、例えば、GAL4（Giniger, E., Cell, 1985, 40: 767-774）、p53（Chumakov, P. M., Genetika, 1988, 24: 602-612）、GCN4（Hinnenbusch, A. G., Proc. Natl. Acad. Sci., 1984, 81: 6442-6446）、VP16（Triezenberg, S. J., Genes. Dev., 1988, 2: 718-729）、RelA（Nolan, G. P., Cell, 1991, 64: 961-969）、Oct-1（Strum, R. A., Genes. Dev., 1988, 2: 1582-1599）、c-Myc（Watt, R., Nature, 1983, 303: 725-728）、c-Jun（Angel, P., Cell, 1988,

55: 875-885)、MyoD(Write, W. E., Cell, 1989, 56: 607-617)などの転写因子において同定されているDNA結合ドメインが挙げられる。

「核移行能を有しない転写因子をコードするDNA」は、例えば、転写因子をコードするDNAのうち核移行シグナルをコードするDNA配列を完全にあるいは部分的に欠失させる方法、部位特異的変異導入法により核移行シグナル内の配列を置換する方法、核以外の細胞内局在性のシグナルを付加する方法、転写活性化ドメインとDNA結合ドメインを融合する方法、またはこれらの方法を適宜組み合わせるなどして調製することが可能である。これらの方法における一般的な遺伝子操作は、文献(Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.)に記載されている。

本発明の方法に用いられる「被検DNA」としては、タンパク質あるいはその部分ペプチドをコードするDNAであれば特に制限はなく、cDNA、ゲノムDNA、および合成DNAなどが含まれる。核移行能を有しない転写因子をコードするDNAと被検DNAとの融合は、常法(Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)により行うことが可能である。

核移行能を有しない転写因子をコードするDNAと被検DNAとの融合DNAは、通常、適当な発現ベクターに組み込み真核生物宿主に導入する。発現ベクターとしては、真核生物宿主内において、核移行能が除去された特定の転写因子をコードするDNAと被検DNAとの融合DNAにコードされるタンパク質を安定的に発現できるものであれば特に制限はないが、宿主と大腸菌の両方で安定的に維持されるシャトルベクターの機能を持つものが好ましい。例えば、宿主としてパン酵母を用いる場合には、ベクター内に複製起点を持たず酵母の染色体に組み込まれる組み込み型ベクターや、ベクター内に複製起点を持ちプラスミドとして存在するプラスミドベクター(セントロメアベクター(低コピー)あるいは2 μ ベクター(高コピー)など

が市販されている)に、該タンパク質を発現するためのユニット(この発現ユニット内には、パン酵母で機能するプロモーター領域[ADH1あるいはGAL1のプロモーター領域など]、発現タンパク質のコード領域、マルチクロニングサイト、ターミネーター領域[ADH1などのターミネーター領域]が含まれている)を導入して使用することができる。具体的には、組み込み型ベクターおよびセントロメアベクターに関しては、STRATAGENE社から「pRSベクター」として宿主の栄養要求性を相補するための各種栄養要求マーカー遺伝子(LEU2、HIS3、URA3、TRP1など)を有するベクターが販売されており、それぞれのマーカー遺伝子に対応した宿主変異株がキットとして添付されている。また、2 μ ベクターに関しても、宿主の栄養要求性を相補するための各種栄養要求マーカー遺伝子(LEU2、HIS3、URA3、TRP1など)を有する「Two-Hybrid system」で使用されている市販ベクター(STRATAGENE社のHybriZapII、GAL4 Two-Hybrid Phagemid vector、CLONTECH社のMATCHMAKER vector など)とそれぞれのベクターに対応する宿主変異株を利用することができる。一方、動物細胞を宿主として用いる場合には、市販の一般的な哺乳動物発現ベクターとして、染色体に組み込まれるベクター(CLONTECH社のpMAM、pMAM-neoなど)やエピソームとして保持されるベクター(CLONTECH社のpDR2、pDR2 vector systemなど)などと適当な宿主動物細胞(CHO、Mouse Fibroblast、Hela、U937、BHKなど)とを組み合わせ使用することができる。また、COS細胞などを用いた一過的な発現を行うためのベクターpMT2など(Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.)も使用することが可能である。発現ベクターへの上記融合DNAの挿入は、常法(Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.)により行うことが可能である。

また、本発明において上記融合DNAが導入される「真核生物宿主」としては、上記融合DNAにコードされるタンパク質を安定的に発現できるものであれば特に制限

はないが、取り扱いの簡便さ、遺伝子の導入および回収の容易さ、安全性などの点で特に酵母および動物培養細胞が好ましい。本発明において用いられる真核生物宿主は、特定の転写因子が結合し活性化するプロモーター領域および該プロモーター領域の下流に連結したレポーター遺伝子を核内に保持する。

「転写因子が結合し活性化するプロモーター領域」としては、転写因子が結合するためのUAS (upstream activating sequence) あるいはオペレーター配列と呼ばれるシス制御領域とTATA配列とを含み、転写因子がUASに結合することにより特異的に転写の活性化が起こるプロモーター領域であれば特に制限はなく、例えば、パン酵母の場合、シス制御領域としては、天然のGAL1 UAS (GAL4の結合配列を4つ含む)、人工的なGAL1 UAS (GAL4の結合配列を3つ含む)、LexA UAS (LexAの結合配列を1～8個含む) (Estojak, J., *Mole. Cell. Biol.*, 1995, 15: 5820-5829)などが挙げられ、また、TATA配列としてはGAL1 TATA、CYC1(cytochrome C 1) TATA、LEU2 TATA、HIS3 TATAなどが挙げられる。これらのシス制御領域とTATA配列との組み合わせにより、発現量や誘導の条件が異なる種々のプロモーター領域が構築されている (CLONTECH社製、Yeast Protocols Handbook, PT3024-1: 5-8)。すなわち、シス制御領域に転写因子の結合する配列が存在し、プロモーターの活性が該転写因子によって制御されるようなプロモーター領域であればどのようなものでもよい。

また、「レポーター遺伝子」としては、例えば、遺伝学的な解析が進んでいるパン酵母では、宿主の栄養要求性に関する遺伝子 (LEU2、HIS3、TRP 1、URA3など) や必須栄養源の資化に関する遺伝子 (GAL1など)、あるいは生存するために必須とされるその他の遺伝子の欠損を相補することができるようなものをレポーター遺伝子とすれば、宿主の生死で遺伝子の発現を簡便に検出することが可能である。さらに、汎用的なレポーター遺伝子として知られる、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ルシフェラーゼなどの酵素活性で検出可能なものや、生きたままの状態で直接蛍光を検出できるグリー

ンフルオレセントプロテイン（CLONTECH社製）なども利用可能である。また、動物細胞においても、前述の汎用レポーター遺伝子や薬剤耐性遺伝子を利用することができる。

上記プロモーター領域とレポーター遺伝子との連結は、常法（Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.）により行うことが可能である。

転写因子が結合し活性化するプロモーター領域および該プロモーター領域の下流に連結したレポーター遺伝子は、例えば、パン酵母を宿主とした場合には、酢酸リチウム法などの常法（CLONTECH社、Yeast Protocols Handbook, PT3024-1: 17-20）によって遺伝子の導入が可能であり、使用するベクターの違い（前述の組み込み型ベクターか、プラスミドベクターか）によって目的の遺伝子を染色体上に組み込むのか、核内のプラスミドとして存在させるのかを選択することができる。動物細胞の場合も、リボソーム法などの常法（Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.）によって遺伝子の導入が可能であり、使用するベクターの違い（前述の組み込み型ベクターか、エピソームベクターか）によって目的の遺伝子を染色体上に組み込むのか、核内のエピソームとして保持させるのかを選択することができる。

また、上記プロモーター領域およびレポーター遺伝子を細胞内に保持する真核宿主生物としては、市販のものを用いることも可能である。例えば、転写因子のDNA結合ドメインとしてLexAを用いる場合には、LexAオペレーター配列を有するプロモーター領域とその下流のレポーター遺伝子であるLEU2と β -ガラクトシダーゼを、それぞれ染色体上とプラスミド上に持つことを特徴としている酵母EGY48[p8 OP-lacZ]（CLONTECH社より入手可能）を用いることが可能である。

真核生物宿主への、核移行能が除去された特定の転写因子をコードするDNAと被検DNAとの融合DNAを含むベクターの導入法は、例えば、パン酵母を宿主とした場

合には、酢酸リチウム法などの常法（CLONTECH社製、Yeast Protocols Handbook, PT3024-1: 17-20）によって行うことが可能であり、使用するベクターの違い（前述の組み込み型ベクターか、プラスミドベクターか）によって目的の遺伝子を染色体上に組み込むのか、核内のプラスミドとして存在させるのかを選択することができる。動物細胞の場合も、リボソーム法などの常法（Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.）によって遺伝子の導入が可能であり、使用するベクターの違い（前述の組み込み型ベクターか、エピソームベクターか）によって目的の遺伝子を染色体上に組み込むのか、エピソームとして保持させるのかを選択することができる。

これにより得られた形質転換体におけるレポーター遺伝子の発現は、レポーター遺伝子として、例えば、遺伝学的な解析が進んでいるパン酵母では、宿主の栄養要求性に関係する遺伝子（LEU2、HIS3、TRP 1、URA3など）や必須栄養源の資化に関係する遺伝子（GAL1など）、あるいは生存するために必須とされるその他の遺伝子の欠損を相補することができるようなものを用いれば、宿主の生死で遺伝子の発現を簡便に検出することが可能である。また、汎用的なレポーター遺伝子として知られる、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ルシフェラーゼなどの場合には酵素活性で検出可能であり、グリーンフルオレセントプロテイン（CLONTECH社製）などの場合は、生細胞の発する蛍光を直接検出できる。動物細胞においても同様に、前述の汎用レポーター遺伝子や薬剤耐性遺伝子を利用して発現の検出を行うことができる。その結果、レポーター遺伝子の発現が検出されれば、被検DNAが核移行能を有するペプチドをコードしていると考えられ、一方、レポーター遺伝子の発現が検出されなければ、被検DNAが核移行能を有するペプチドをコードしていないと考えられる。

また、本発明は第二に、核移行能を有しない転写因子をコードするDNAと被検DNAとの融合DNAを、該転写因子が結合し活性化するプロモーター領域および該プロ

モーター領域の下流に連結したレポーター遺伝子を核内に保持する真核生物宿主に導入し、該レポーター遺伝子の発現を検出し、発現が検出された真核生物宿主から被検DNAを単離することを特徴とする、核移行能を有するペプチドをコードする被検DNAの単離方法に関する。レポーター遺伝子の発現が検出された真核生物宿主からの被検DNAの単離は、例えば、パン酵母に関しては、被検DNAがプラスミド（酵母－大腸菌シャトルベクター）上に存在する場合は、単一のコロニーからプラスミドを精製した後、該プラスミドを用いて大腸菌の形質転換を行い、該形質転換体からプラスミドを精製し直すことにより行うことが可能である。あるいは、単一のコロニーから全DNAを精製し、それを鋳型としてPCRにより被検DNAを増幅して単離することも可能である（CLONTECH社製、Yeast Protocols Handbook, PT30 24-1: 29-37）。動物細胞に関しても、基本的に、単一のコロニーから全DNAを精製し、それを鋳型としてPCRにより被検DNAを増幅して単離することが可能である。

また、本発明は、核移行能を有しない転写因子をコードするDNAに被検DNAの導入部位が隣接するベクター、並びに該ベクターおよび転写因子が結合するプロモーター領域および該プロモーター領域の下流に連結したレポーター遺伝子からなる発現ユニットを核内に保持する真核生物宿主を含むキットに関する。本発明のベクターは、被検DNAの導入部位に被検DNAを導入して、該転写因子が結合するプロモーター領域および該プロモーター領域の下流に連結したレポーター遺伝子からなる発現ユニットを核内に保持する真核生物宿主に導入する。被検DNAの導入部位は、通常、ベクター上において特定の制限酵素により唯一の切断を受ける部位である。真核生物宿主へのベクターの導入の結果、真核生物宿主内でレポーター遺伝子の発現が検出されれば、ベクター内に導入した被検DNAは核移行能を有するペプチドをコードしていると考えられ、一方、レポーター遺伝子の発現が検出されなければ、ベクター内に導入した被検DNAは核移行能を有するペプチドをコードしていないと考えられる。これにより、被検DNAが核移行能を有するペプチドをコードしているか否かを簡便に検出し、また核移行能を有するペプチドをコードす

るDNAを簡便に単離することが可能である。特に、上記ベクターを用いてDNAライブラリーを構築し、これを上記真核生物宿主に導入し、レポーター遺伝子の発現を検出すれば、ライブラリーの中から核移行能を有するペプチドをコードするDNAを高効率で網羅的に単離することが可能である。

図面の簡単な説明

- 図1は、プラスミド「pLexAD」を示す。
- 図2は、プラスミド「pLexADrev」を示す。
- 図3は、プラスミド「pRS1F」を示す。
- 図4は、プラスミド「pRS3F」を示す。
- 図5は、被検ペプチドとの融合に用いる転写因子の核移行能のアッセイを示す。
- 図6は、被検ペプチドを融合した転写因子の核移行能のアッセイを示す。
- 図7は、プラスミド「pNS」を示す。
- 図8は、プラスミド「pNS」を用いた各種ペプチドの核移行能のアッセイを示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、以下の実施例においては、特に記載する場合を除き、基本的な遺伝子工学的手法は文献（Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.）に従った。また、制限酵素およびその他の修飾酵素などの遺伝子工学製品は宝酒造から購入し、それぞれの使用条件は添付マニュアルに従った。また、大腸菌からのプラスミドの精製は「QIAprep Kit」（QIAGEN社製）を用いた。また、塩基配列の確認は「ABI PRISM 377」（PERKIN ELMER社製）を用

いた。解析用試料の調製は同社の試薬を用い、使用法は製品マニュアルに従った。また、酵母の取り扱い(培地、宿主、シャトルベクター、遺伝子の導入法、レポーター遺伝子のアッセイ法、遺伝子の単離法など)については、「MATCHMAKER Lex A Two-Hybrid System」(CLONTECH社製)を使用し、添付の「Yeast Protocols Handbook」に従った。また、カスタムオリゴヌクレオチドの合成は東亜合成社に依頼した。

〔実施例1〕 核移行タンパク質トラップベクターの作製

(1) GAL4転写活性化ドメインをコードするDNA配列のPCRによる増幅

5'側にadd-in EcoRIサイトをデザインした「プライマーNU13」(配列番号:1)および「MATCHMAKER 3' AD LD-Insert Screening Amplimer」(配列番号:2)(CLONTECH社製)とをプライマーに用い、「プラスミドpACT2」(CLONTECH社製)を鋳型として、GAL4転写活性化ドメイン(塩基配列を配列番号:3に示す)を含むDNA断片を「GeneAmp PCR System 2400」(PERKIN ELMER社製)にて増幅した。Taqポリメラーゼとしては「TaKaRa Ex Taq」(TaKaRa社製)を使用し、反応条件などは製品マニュアルに従った。これにより増幅されたDNA断片をエタノール沈殿にて精製し、制限酵素EcoRIとNcoIによる消化を行った後、6%のポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、目的のDNA断片をゲルから切り出して電気溶出法により回収した。

(2) LexAタンパク質とGAL4転写活性化ドメインとの融合タンパク質を発現させるベクター「pLexAD」の作製

プラスミド「pLexA」(CLONTECH社製)のマルチクローニングサイト内のEcoRIサイトとNcoIサイトの間に上記(1)のGAL4転写活性化ドメインをコードするDNA断片を挿入して「pLexAD」を構築した(図1)。塩基配列を決定して目的の断片が正しく挿入されていることを確認した。なお、LexA遺伝子の塩基配列を配列番号:4に示す。

(3) LexAのN末端に核外移行シグナル(NES)を挿入したベクター「pLexADrev」

の作製

HIVのRevタンパク質が有する核外移行シグナル(配列番号:5)を以下のように合成し、「pLexAD」がコードするLexAタンパク質のN末端近傍のHpaIサイトに挿入した。センス鎖として「NU9」(配列番号:6)、アンチセンス鎖として「NU10」(配列番号:7)を合成し、それぞれT4ポリヌクレオチドキナーゼで5'末端をリン酸化した後、両者をアニールさせた。このDNA断片を、予めHpaI消化後アルカリフォスファターゼによる脱リン酸化処理を行った「pLexAD」に挿入して「pLexADrev」を構築した(図2)。目的の断片が正しく挿入されていることは、塩基配列を決定して確認した。

(4) LexAタンパク質とGAL4転写活性化ドメインとの融合タンパク質を発現させるためのCEN/ARS領域を複製起点にもつプラスミド「pRS1F」とNESを挿入したLexAタンパク質とGAL4転写活性化ドメインとの融合タンパク質を発現させるためのCEN/ARS領域を複製起点にもつプラスミド「pRS3F」の構築

核外移行シグナル(NES)を挿入しない通常のLexAタンパク質とGAL4転写活性化ドメインとの融合タンパク質と、N末端にNESを挿入したLexAタンパク質とGAL4転写活性化ドメインとの融合タンパク質(該融合タンパク質のアミノ酸配列を併記した塩基配列を配列番号:8に示す)とをそれぞれ酵母内で発現するために必要な最小ユニットは、前者の場合は「pLexAD」を、後者の場合は「pLexADrev」をSphIで消化して得られる約1.7kbのDNA断片である。この発現ユニット内には、ADH1プロモーター領域、発現タンパク質のコード領域、マルチクローニングサイト、ADH1ターミネーター領域が含まれている。それぞれの発現ユニットのDNA断片を精製した後、予めプラスミド「pRS413」(STRATAGENE社製)(酵母シャトルベクター、CEN/ARS origin)のマルチクローニングサイトを含むPvuII消化断片の部分、汎用プラスミドpUC19のマルチクローニングサイトを含むPvuII消化断片で置換たベクター「pRSF」のSphIサイトに挿入して「pRS1F」と「pRS3F」を構築した(それぞれ図3、図4)。目的の断片が正しく挿入されていることは塩基配列を決定し

て確認した。このようにして構築した「pRS1F」(ポジティブコントロール)および「pRS3F」は、転写因子として機能する融合タンパク質の直後にpLexA由来のマルチクローニングサイトが存在しているので、目的のcDNAなどのDNA断片を常法により容易に融合して発現させることが可能である。

〔実施例2〕 人工的な核移行タンパク質cDNAの融合による核移行タンパク質トラップベクター「pRS3F」の有効性の実証

(1) 既知のcDNA断片の融合

既知のcDNA断片として、細胞質に局在することが認められている分泌シグナルを除去した緑膿菌の分岐鎖アミノ酸結合タンパク質('BraC) (該タンパク質のアミノ酸配列を併記した塩基配列を配列番号:9に示す) (田中真人、新生化学実験講座6 [日本生化学会編]、生体膜と膜輸送(下)、1992、東京化学同人、9・15)と、そのN末端にSV40ラージT抗原由来の核移行シグナルを融合させた人工的な核移行タンパク質とをコードするcDNA断片を「pRS3F」のGAL4転写活性化ドメインのC末端にインフレーム(in-frame)で融合させた。実際には、「'BraC」をコードするDNA断片(NcoI-DraI)を、予めXhoIで消化後、クレノウ処理により平滑末端化し、その後NcoI消化して精製した「pRS3F」に挿入して「pRS3F' BraC」を構築した。さらに、この「pRS3F' BraC」をNheIとNcoIで消化して精製したベクターに、SV40ラージT抗原由来の核移行シグナル(配列番号:10)をコードする合成DNA断片、すなわち、センス鎖として「NU17」(配列番号:11)、アンチセンス鎖として「NU18」(配列番号:12)を合成し、それぞれT4ポリヌクレオチドキナーゼで5'末端をリン酸化した後、両者をアニールさせたものを挿入して「pRS3FN' BraC」を構築した。また、対照実験のために、「'BraC」断片を持たず、核移行シグナルのみを持つ「pRS3FN」も同様に構築した。目的の断片が正しく挿入されていることは、塩基配列を決定して確認した。

(2) レポーター遺伝子の発現による核移行能のアッセイ

上述(1)の3種類のプラスミド「pRS3F' BraC」、「pRS3FN' BraC」、「pRS3FN」と

[実施例1]で構築した「pRS1F」、「pRS3F」をそれぞれ用い、LexAオペレーター配列を有するプロモーター領域（配列番号:13）（Estojak, J., Mole. Cell. Biol., 1995, 15: 5820-5829）とその下流のレポーター遺伝子であるLEU2と β -ガラクトシダーゼをそれぞれ染色体上とプラスミド上に持つ宿主酵母EGY48[p80P-lacZ]（CLONTECH社より入手）を形質転換した。目的のプラスミドが宿主に導入されたことは、栄養要求マーカーであるHISの相補性で確認した。次に、レポーター遺伝子の発現をアッセイするための培地(SD/-LEU, -HIS, -URA, X-gal)にそれぞれの形質転換体をレプリカし、30°Cで2-3日培養した。その結果、人工的な核移行タンパク質を融合させた「pRS3FN' BraC」、核移行シグナルのみを融合させた「pRS3FN」、またポジティブコントロールとして「pRS1F」を導入したものは、レポーター遺伝子である β -ガラクトシダーゼとLEU2の両方が発現しており、青色の発色と正常な生育の両方が確認できた（図5、図6）。一方、核移行シグナルを持たないタンパク質を融合した「pRS3F' BraC」、何も融合していない「pRS3F」を導入したものは、レポーター遺伝子はほとんど発現せず、青色の発色も生育も認められなかった（図5、図6）。

以上の結果から、あるペプチドをコードするDNA断片を、「pRS3F」がコードする転写因子のC末端にインフレーム（in-frame）で融合させて、酵母内で発現させることにより、核移行能の有無をレポーター遺伝子の発現を指標に簡便に検出することができた。

[実施例3] cDNAライブラリー作製用ベクターpNSの構築

「pRS3F」の改良を行った。改良点は以下の3点である：①LexAとGAL4ADの接合部分のEcoRIサイトを取り除いた。②マルチクローニングサイトに新たにEcoRIサイトを導入した。③「pRS413」由来の不必要な領域を取り除き、可能な限り最小化した。

まず、「pLexADrev」のEcoRIサイトに合成リンカー、センス鎖として「NU31」（配列番号:14）、アンチセンス鎖として「NU30」（配列番号:15）を挿入し、プラ

スミド「pLexADrev-dE」とした。この「pLexADrev-dE」を制限酵素SphIで消化した得られた約1.7kbのADH1発現ユニットを含んだDNA断片を、汎用プラスミドpUC19のSphIサイトにサブクローニングし、プラスミド「pULexADrev-dE」とした。次に、この「pULexADrev-dE」のNheIサイトとNcoIサイトの間にEcoRIサイトを持つ合成リンカー、センス鎖として「NU28」（配列番号:16）、アンチセンス鎖として「NU29」（配列番号:17）を挿入し、プラスミド「pULexADrev-E」とした。一方、「pRS413」をDraIIIとPvuIIで消化して757bpのマルチクローニングサイト含むDNA断片を取り除き、そこにSphIサイトを持つ合成リンカー、センス鎖として「NU25」（配列番号:18）、アンチセンス鎖として「NU26」（配列番号:19）を挿入し、プラスミド「pRS-S」とした。この「pRS-S」のSphIサイトに、前述の「pULexADrev-E」をSphI消化して得られた約1.7kbのADH1発現ユニットを含んだDNA断片を挿入して、cDNAライブラリー作製のベクターpNS（図7）を構築した（ADH1による転写方向は、HIS3の転写方向と同一である）。

〔実施例4〕融合タンパク質発現ライブラリー（ヒト培養細胞NT2前駆細胞由来の作製と核移行アッセイ

（1）融合タンパク質発現ライブラリーの作製

mRNAは、ヒト培養細胞NT2前駆細胞(Stratagene社製)を添付プロトコール(Catalog #204101, Revision #036002a)に従って培養し、市販のトータルRNA抽出キットおよびmRNA抽出キット(Pharmacia社製)により調製した。その一部(3μg)を使用して市販のcDNA合成キット(Pharmacia社製)によりcDNAライブラリーを作製した。具体的には、oligo(dT)12-18プライマーを利用してcDNA合成を行い、pNSベクターのEcoRI/NotIサイトに挿入した。なお、cDNAの挿入は、Directional Cloning Toolbox (Pharmacia社製)を用いることにより、一方向性とした。その後、作製したcDNAライブラリーの一部を用い、常法(新細胞工学実験プロトコール、秀潤社、114-115)に従ってエレクトロポレーション(BIO RAD社製 Gene Pulser)により市販の大腸菌(GibcoBRL社製 ElectroMAX DH10B Cells)を形質転換した。得られた形

質転換体をアンピシリン(100 μ g/ml)を含むLB寒天培地で30°Cで16時間培養し、集菌後プラスミドを調製した(QIAGEN社製 QIAGEN Maxi kit)。

(2) 酵母を用いた核移行アッセイ

調製した融合タンパク質発現ライブラリーのプラスミド60 μ gを用いて、常法(CLONTECH社、Yeast Protocols Handbook, PT3024-1: 17-20)によりEGY48株を形質転換した。レポーター遺伝子LEU2の発現によりクローンを選択する目的でSD寒天培地(-His/-Leu)にて30°Cで3～7日培養したところ、約1000個のポジティブクローンが得られた。

(3) 塩基配列の決定

このようにして得られたポジティブクローンの一部(12クローン)についてベクターに挿入されたcDNA断片の塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定を行うために、まず各クローンからテンプレートDNAをコロニーPCRによって調製した。20 μ lのPCR反応液(耐熱性DNAポリメラーゼ(TaKaRa社製 Ex Taq) 0.5unit、dNTP mixture 各4nmol、「プライマーNU15」(配列番号:20)、「プライマーNU36」(配列番号:21)を各0.4 μ mol、2 μ lの添付バッファー、および滅菌水)に各クローンから掻き取った少量の菌体を加え、「GeneAmp PCR System 2400」(PERKIN ELMER社製)で変性94°C、アニーリング60°C、伸張72°C、サイクル数40の条件にて挿入cDNA断片の増幅を行った。各PCR産物について、Microcon-100(Millipore社製)にて脱塩および未反応プライマーの除去を行いテンプレートDNAを得た。こうして得られたテンプレートの一部(100～200ng)を用い、ABI社の製品マニュアルに従った方法で塩基配列の決定を行った。

(4) 得られたクローンのデータベース解析

各クローンの塩基配列を公共データベースであるNational Center for Biotechnology Information (NCBI) のBasic BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-blast?Jform=0>)で検索した。その結果、12クローン全てが既知の遺伝子と一致した。その内、これまでに核内で機能することが報告あるいは示

唆されているのは10クローンあり、その中の5クローンは塩基性アミノ酸に富んだSV40ラージT抗原タイプの核移行シグナル様配列を有するNP220(Inagaki, H., J. Biol. Chem., 1996, 271: 12525-12531)、PC4(Ge, H., Cell, 1994, 78: 513-523)、ERC-55(Imai, T., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1997, 233: 765-769)、ヒストン結合タンパク質(0' Rand, M. G., Dev. Biol., 1992, 154: 37-44)、プロサイモシン α 1(Manrow, R. E., J. Biol. Chem., 1991, 266: 3916-3924)、1クローンは核内外の往復移動を司るM9配列を有するhnRNPA1(Michael, W. M., Cell, 1995, 83: 415-422)であった。また、4クローンは既知の核移行シグナルを有さないferritin H chain(Cai, C. X., J. Biol. Chem., 1997, 272: 12831-12839)、シャペロニン10(Bonardi, M. A., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1995, 206: 260-265)、プロテインキナーゼCインヒビター-I(Brzoska, P. M., Proc. Natl. Acad. Sci., 1995, 92: 7824-7828)、ステロイドレセプターコアクチベーター1(Onate, S. A., Science, 1995, 270: 1354-1357)であった。現在のところ核内で機能することが報告されていない残りの2クローン、トロポミオシン(Lin, C. -S., Mol. Cell. Biol., 1988, 8: 160-168)、G-リッチシーケンスファクター-1(Qian, Z., Nucleic Acids Res., 1994, 22: 2334-2343)については既知の核移行シグナルは認められなかった。

[実施例5]融合タンパク質発現ライブラリー（ヒト胎児脳由来）の作製と核移行アッセイ

(1)融合タンパク質発現ライブラリーの作製

まず、市販のヒト胎児脳cDNAライブラリー（GibcoBRL社製SUPERSCRIPRTライブラリー）を添付のプロトコールに従って増幅した後、QIAGEN社製のプラスミド精製キットを用いcDNA断片をインサートに持つプラスミドを精製した。次に、その一部（30 μ g）から2種類の制限酵素EcoRIとNotIを用いて切り出されたcDNA断片を、0.8%のアガロース電気泳動により0.7kb～4kbの長さのcDNAに選別して精製した。このようにして得られたcDNA断片を前述のpNSベクターのEcoRI/NotIサイトに挿

入して融合タンパク質発現ライブラリーを作製し、その一部を用い、常法(新細胞工学実験プロトコル、秀潤社、114-115)に従ってエレクトロポレーション(BIO RAD社製 Gene Pulser)により市販の大腸菌(GibcoBRL社製 ElectroMAX DH10B Cells)を形質転換した。得られた形質転換体をアンピシリン($100\mu\text{g/ml}$)を含むLB寒天培地で 30°C で16時間培養し、集菌後プラスミドを調製した(QIAGEN社製 QIAGEN Maxi kit)。

(2)酵母を用いた核移行アッセイ

調製した融合タンパク質発現ライブラリーのプラスミド $60\mu\text{g}$ を用いて、常法(CLONTECH社、Yeast Protocols Handbook, PT3024-1: 17-20)によりEGY48株を形質転換した。レポーター遺伝子LEU2の発現によりクローンを選択する目的でSD寒天培地(-His/-Leu)にて 30°C で3~7日培養したところ、約1000個のポジティブクローンが得られた。

(3)塩基配列の決定

このようにして得られたポジティブクローンの一部(489クローン)についてベクターに挿入されたcDNA断片の塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定を行うために、まず各クローンからテンプレートDNAをコロニーPCRによって調製した。 $20\mu\text{l}$ のPCR反応液(耐熱性DNAポリメラーゼ(TaKaRa社製 Ex Taq) 0.5unit、dNTP mixture 各 4nmol 、「プライマーNU15」(配列番号:22)、「プライマーNU36」(配列番号:23)を各 0.4pmol 、 $2\mu\text{l}$ の添付バッファー、および滅菌水)に各クローンから掻き取った少量の菌体を加え、「GeneAmp PCR System 9600」(PERKIN ELMER社製)で変性 94°C 、アニーリング 60°C 、伸張 72°C 、サイクル数40の条件にて挿入cDNA断片の増幅を行った。各PCR産物について、Microcon-100(Millipore社製)にて脱塩および未反応プライマーの除去を行いテンプレートDNAを得た。こうして得られたテンプレートの一部($100\sim 200\text{ng}$)を用い、ABI社の製品マニュアルに従った方法で塩基配列の決定を行った。

(4)得られたクローンのデータベース解析

489クローンの塩基配列を公共データベースであるNational Center for Biotechnology Information (NCBI) のBasic BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-blast?Jform=0>)で検索した結果、250クローンが既知の97のタンパク質をコードする遺伝子(表1、表2)と一致し、220クローンが新規の核移行タンパク質をコードする遺伝子の候補となる新規の配列あるいは既知のEST (Expressed SequenceTag) 配列をコードする172の遺伝子と一致した。また、19クローンは既知の遺伝子の非翻訳領域由来あるいはコドンの読み枠がずれているものであった。

表1に本発明の方法で単離された遺伝子のうち、核で機能することが報告されているタンパク質をコードする遺伝子を、表2に核で機能することが報告されていない遺伝子を示す。

表1

遺伝子*	GenBank Accession	機能	取得領域の 開始部位*	取得領域の 相対的位置	開口部の 長さ(kb)	Medline UI†
1 9G8 splicing factor	L22253	RNA 結合タンパク質	FOSPSPSRSR→	S/R nch	1.8	94283389
2 AD amyloid NACP (synuclein)	L08850	シナプスノックタンパク質	ILEDMPVOPD→	*	0.7	88316381
3 aldolase A	X05235	解糖酵素	*	*	1.8	92182008
4 beta catenin	Z19054	細胞接着/シグナル伝達分子	VELTSSLFRT→	*	1.9	97047308
5 c-fos	V01512	転写因子	*	NLS, bZIP	2.0	83221560
6 calmodulin	O45887	カルシウム結合タンパク質	PTEAELODM→	*	1.4	96114780
7 CREB-2	M86842	転写因子	GLVSPSNMSK→	NLS, bZIP	1.8	92279218
8 cyclophilin A	Y00052	サイクロフィリン結合タンパク質	*	*	0.8	95394146
9 F-SRC-1	U58302	ステロイドレセプター共役因子	AINOSKSEDO→	*	2.5	96291002
10 GADD153 (CHOP)	S40706	転写因子	*	NLS, ZIP	1.0	93015830
11 Gu binding protein	U78524	Gu および α53 相互作用タンパク質	LKMVMSLRV→	*	2.4	97320420
12 KCENP-B	X55039	筋原性繊維相互作用タンパク質	EDEDODDDEE→	*	1.7	91372020
13 hCREM-2	D14826	転写調節因子	*	NLS, bZIP	2.0	94268157
14 heat shock factor 1 (TCF5)	M84873	転写調節因子	LEHVMGSGPY→	ZIP	1.9	91334376
15 HHR23A protein	D21235	DNA切断/核膜結合体	IPGSPPEHG→	*	1.8	96292259
16 HIRA	X77633	転写調節因子	GDFSTAFFNS→	NLS	2.4	95359996
17 hnRNPC	M16342	リボ核タンパク質	*	*	1.9	87257872
18 hnRNPK	S74678	リボ核タンパク質	YDPHFYDETY→	KNS	1.5	97381839
19 HP1α-gamma	U26312	ヘテロクロマチンタンパク質	KKKRDAADKP→	NLS	1.8	96278941
20 hSNF2b	D26156	転写調節因子	VEEKILAAAK→	NLS	0.7	94268902
21 importin alpha 3	U93240	NLS依存的核移行レセプター	ICLSAVOAAK→	arm	2.4	96270582
22 karyopherin alpha 3	D89618	NLS依存的核移行レセプター	SAQTOAVVOS→	arm	1.9	96270582
23 Ki nuclear autoantigen	U11292	核自己抗原	*	NLS	2.4	86141726
24 Ku protein p70	M32865	DNA結合タンパク質	DSFENPVLOQ→	NLS	0.8	89174787
25 lactate dehydrogenase	Y00711	代謝酵素	NK1TVGVGGQ→	*	2.0	87053963
26 leucine zipper protein (hZIP)	Z50781	推定の転写調節因子	*	ZIP	2.0	91138879
27 M-phase phosphoprotein (mpp6)	X98263	M期リン酸化タンパク質	KKI1ISEEHMY→	NLS	1.7	97039687
28 matrix 3	M63483	主質核マトリックスタンパク質	GGOSDENKDD→	NLS	1.9	91236771
29 NF-κappa-B p65 subunit	M82399	転写因子	ODRHRIEEKR→	NLS	2.0	91173212
30 NP220	D83032	DNA結合タンパク質	IPTGOEKTVD→	NLS	2.5	96218178
31 nucleobindin precursor	M96824	DNA結合タンパク質	QAOLKEYWEE→	ZIP, EF-hand	1.9	92392352
32 nucleosome assembly protein (NAP)	M86667	核組立核膜形成に関与	IPEFRLTVFK→	NLS	2.0	94128073
33 PC4	U12979	転写調節因子	*	NLS	2.0	94304740
34 polyhomeotic 1 homolog (HPH1)	U89277	ホメオティックタンパク質BMI1相互作用タンパク質	HGERDLGNPW→	*	2.4	97220024
35 RBP2=retinoblastoma binding protein	S86431	推定の転写調節因子	LLEYSLEDETO→	NLS	1.9	94020841
36 SMAP	U59919	キネシン関連タンパク質相互作用タンパク質	GLKMLMKRAL→	arm	1.9	98175913
37 spliceosome associated protein (SAP 145)	U41371	U2 snRNPサブユニットタンパク質複合体	ETRLKEKKPG→	NLS	1.7	96154048
38 SWI/SNF complex subunit (BAF170)	U86616	転写調節因子	RYDFQNPSPRN→	NLS, ZIP	2.5	96297413
39 tat interactive protein (TIP60)	U74667	推定の転写調節因子	*	NLS	1.9	96182937
40 TEF=thyrotroph embryonic factor	U44059	転写因子	YMDLDEFLLE→	NLS, bZIP	2.5	96219638
41 TFE3	X51330	転写因子	IQELELQAOI→	NLS	2.0	90249724
42 TFE8	M33782	転写因子	ELTDAESRAL→	NLS, bHLHZIP	1.9	90218407
43 topoisomerase Iib	U54831	DNA切断/修飾酵素	DADDDDDONN→	NLS	1.8	98122794
44 TPR	U89668	核組立核膜相互作用タンパク質	IQMTRROSVG→	*	2.8	97177132
45 TSC-22	U35048	推定の転写調節因子	MYAVREEVEV→	ZIP	1.8	96244585

表 2

遺伝子	GenBank Accession	機能	取得領域の 開始部位	取得領域の 構造的特徴	取得領域の 長さ(kb)
1 ADE2H1	X53793	プリン合成経路に関与	*		2.0
2 aldolase C	X07292	解糖酵素	YPALSAEQKK→		1.8
3 alpha-actinin	X15804	アクチン結合タンパク質	EQVEKGYEEW→	coiled-coil, EF-hand	2.5
4 anusecretory factor-1	U24704	下垂体タンパク質	*	NLS	1.8
5 ASK1	D84478	MAPKKK 哺乳類ホモログ	IRTLFLGIPD→		2.0
6 cell surface glycoprotein	D10653	ME491/CD63 スーパーファミリーに類似	*		2.0
7 coatomer protein (COPA)	U24105	細胞内タンパク質輸送に関与	GHYQNALYLG→	WD-40	2.3
8 colorectal mutant cancer protein	M62397	推定の大腸癌抑制遺伝子産物	E1SSIGVSSS→	NLS	4.2
9 cytoskeletal tropomyosin TM30	X04588	アクチン結合タンパク質	*	coiled-coil	2.0
10 cytosolic malate dehydrogenase	D55654	代謝酵素	*		1.8
11 dihydrolipoamide dehydrogenase	J03620	代謝酵素	IPVNTRFOTK→		1.9
12 epsilon 14-3-3 protein	U28936	シグナル伝達に関与	QMVETELKLI→		1.8
13 ERC-55	X78669	小胞体カルシウム結合タンパク質	LKDKRRFEKA→	NLS, EF-hand	1.9
14 fibroblast tropomyosin TM30	X05276	アクチン結合タンパク質	YEEIKLLSD→	coiled-coil	1.8
15 glial fibrillary acidic protein (GFAP)	J04569	中間フィラメント	OYEAMASSNM→	coiled-coil	2.4
16 glutathione S-transferase M3 (GSTM3)	J05459	解毒・塩化物的GST	ESSMVLGYWD→		0.7
17 golgin-95	L06147	推定のゴルジ複合体タンパク質	OYVAAYQQLT→	coiled-coil	2.5
18 hCDC10=CDC10 homolog	S72008	酵母のCDC10に類似	REHVAKMKKM→	NLS, ZIP	1.8
19 HsGAK	D88435	サイクリンG相互作用キナーゼ	QGPPEDLLSE→		2.0
20 hSIAH2	U78248	ショウジョウバエ sina のホモログ	EHEDICEYRP→		1.9
21 KIAA0116	D29958	機能未知	VTLSEAEKVY→		0.9
22 KIAA0136	O50926	機能未知	QLLLVTEEKE→		2.5
23 KIAA0171	O79993	機能未知	QATMTSSOSH→		2.2
24 KIAA0181	D80003	機能未知	QNLVSKETST→	NLS	0.8
25 KIAA0332	AB002330	機能未知	IPIDATPIDD→	NLS	1.7
26 KIAA0365	AB002363	機能未知	SGCPLOVKKK→	NLS	2.0
27 KIAA0373	AB002371	機能未知	IISATSQKEA→	NLS	0.6
28 KIAA0432	AB007892	機能未知	SAP11NFSAQ→		2.3
29 kinectin	L25616	推定のカイネシンレセプター	OKLQALANEQ→	coiled-coil	2.8
30 kinesin-2 (HK2)	Y08319	カイネシンモータータンパク質スーパーファミリー	RVKELTVQPT→	coiled-coil	2.4
31 LGN protein	U54999	G alpha i2 相互作用タンパク質	IPNSQRKISA→		1.9
32 malate dehydrogenase	U20352	代謝酵素	*		1.8
33 mitotic kinesin-like protein 1	X67155	カイネシンモータータンパク質スーパーファミリー	EFDMVLSKE→	NLS, coiled-coil	2.6
34 N-ethylmaleimide-sensitive factor	U03985	膜輸送に関与	LASLENDIKP→		2.5
35 nei-related protein (NRP1)	D83017	ネルタンパク質に類似	RNOKHGLFKG→	EGF-like	2.3
36 neurocan (CSPG3)	AF026547	アグリカン糖タンパク質ファミリー	PAQVKNKAEHS→	NLS	2.0
37 neurofilament-66	S78296	中間フィラメント	LAFVROVHDE→	coiled-coil	2.5
38 non-muscle myosin heavy chain-B	M69181	アクチン結合タンパク質	KKLKSLEAEI→	coiled-coil	2.5
39 phosphoglycerate mutase (PGAM-B)	J04173	ホスホグリセリン酸ムターゼファミリー	*		2.4
40 por1	X97567	Rac1 相互作用タンパク質	FGGSRRTVD→	coiled-coil	1.8
41 Rabaptin-5	X91141	small GTPase Rab5 のエフェクタータンパク質	IQIQEAETRD→	coiled-coil	2.0
42 Rap2 interacting protein 8 (RPIP8)	U93871	small GTPase Rap2 相互作用タンパク質	KFRIVYQKGG→		1.8
43 restin	X64838	中間フィラメント相互作用タンパク質	KFKDADEEK→	NLS, coiled-coil	2.3
44 RIG-like 7-1	AF034208	リボソームタンパク質	DNQRDCQPL→		1.8
45 RING zinc finger protein (RZF)	AF037204	推定の転写因子	KTKKTCPCVK→		1.9
46 secretogranin I(chromogranin B)	Y00064	膜輸送に関与	PEYGEEIXGY→	NLS	1.7
47 SH3GL2	X99657	SH3ドメインを持つGrb-2に類似	LHOKDLREIQ→	NLS, SH3	2.1
48 STAM	U43899	シグナル伝達アダプター分子	OPNWNKGETH→	ITAM	2.4
49 Tax1-binding protein TXBP151	U33821	推定の転写抑制因子	SKEDTCFLKE→		1.9
50 TFG protein	Y07968	甲状腺癌に関与	LRRLEIELRN→	coiled-coil	1.9
51 trophinin	U04811	細胞接着因子	PSNSIGFGAA→		1.9
52 vimentin	Z19554	中間フィラメント	ELQAQIQEQH→	coiled-coil	1.7

なお、表中の記号は以下の意である。

^a取得された遺伝子はグループ分けされた中で最も短い挿入断片を代表として示してある。

^b挿入された遺伝子断片がコードするタンパク質のアミノ末端から10アミノ酸残基を示してある。

^c核での機能を報告している文献のMedline Unique Identifier

*翻訳領域をすべて含むクローン

S/R rich: セリン/アルギニンに富む領域、NLS: 塩基性残基に富む推定の核移

行シグナル、ZIP：ロイシンジッパー、bZIP：塩基性ロイシンジッパー、KNS：hnRNP K 核輸送シグナル、arm：アルマジロリビート、bHLHZIP：塩基性ヘリックスループヘリックスロイシンジッパー、SH3：Srcホモロジードメイン3、ITAM：immunoreceptor tyrosine-based activation motif

表1および表2に示したように、97の既知タンパク質の少なくとも約半数が核内で機能することが報告されているタンパク質であり、特に転写制御因子、DNA/RNA結合タンパク質などの割合が高かった。従って、新規の遺伝子に関しても、核内で機能する未知のタンパク質をコードする遺伝子が高効率かつ特異的に得られていることが容易に予想される。また、単離したクローンの内hnRNP Kタンパク質については核内外の往復移動を司るKNS配列(Matthew, W., EMBO J., 1997, 16:3587-3598)が認められた。本発明の方法により単離したクローン中に、核内外の移動を司るM9配列やKNS配列が認められたことは、本発明の方法が単に核移行タンパク質のみを高効率かつ特異的に選択できるだけでなく、核内外を移動するタンパク質一般(核外→核内、核内→核外)の選択にも拡張可能なことを実証するものである。

【実施例6】 既知の核移行タンパク質をコードするcDNAの融合による核移行タンパク質トラップベクター「pNS」の有効性の実証

(1) 既知のcDNA断片の融合プラスミドの構築

細胞質に局在するタンパク質の代表として、「 γ BraC」(田中真人、新化学実験講座6 [日本生化学会編]、生体膜と膜輸送(下)、1992、東京化学同人、9・15)、カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ「CaMKK」(Tokumitsu, H., J. Biol. Chem., 1995, 270(33): 19320-19324; 徳光浩、[CaMKKの細胞内局在]、未発表データ)のcDNAを用いた。また、核に局在し、典型的な核移行シグナルを有するタンパク質の代表として、SV40の「NLS」、SV40の「NLS」と「 γ BraC」を人工的に融合させた「NLS- γ BraC」、転写因子であるNF-kappa-

B p65サブユニット「NFKBp65」(Ganchi, P.A., Mol. Biol. Cell, 1992, 3(12): 1339-1352)、同じく転写因子である「c-Fos」(Tratner, I., Oncogene, 1991, 6(11):2049-2053)のcDNAを用いた。「LexAD」は「pRS1F」、「NES-LexAD」は「pNS」、「NES-LexAD-NLS」は「pRS3FN」、「NES-LexAD-'BraC」は「pRS3F' BraC」、「NES-LexAD-NLS-'BraC」は「pRS3FN' BraC」のプラスミドをそれぞれ用いた。「NES-LexAD-NFKBp65」は「pME18S(N)-p65」(Tsuboi A., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1994, 199(2): 1064-1072)を鋳型にプライマー「NU32」(配列番号: 24)と「NU24」(配列番号: 25)を用いて「NFKBp65」をPCRで増幅した後、制限酵素MunIとNotIで消化して精製した断片を、「pNS」のEcoRI/NotIサイトに挿入して作製した。同様に「NES-LexAD-cFos」も「pME18S(N)-c-Fos」(Tsuboi A., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1994, 199(2): 1064-1072)を鋳型にプライマー「NU34」(配列番号: 26)および「NU24」を用いて「c-Fos」をPCRで増幅した後、「pNS」のEcoRI/NotIサイトに挿入して作製した。「NES-LexAD-CaMKK」は「pET-CaMKK」(徳光浩氏より授与)を制限酵素NcoIで消化して生成した「CaMKK」cDNA断片を、「pNS」のNcoIサイトに挿入して作製した。

(2) レポーター遺伝子の発現による核移行能の検出

それぞれのプラスミドをEGY48株に導入してレポーター遺伝子であるLEU2遺伝子の発現を観察した。前述(1)の種々のプラスミドを用いて形質転換を行った後SD培地(-HIS、-LEU)上に直接プレーティングした。図8は、30°Cで約3日間培養した結果である。NESを持たない「LexAD」はおそらく核内への受動的な拡散が原因でコロニー形成が起っていると考えられる。ところが、NESを導入した「NES-LexAD」ではコロニーの形成が完全に抑えられた。しかし、さらにNLSを導入した「NES-LexAD-NLS」では再びコロニーの形成が認められた。同様に典型的なNLSを有する「NES-LexAD-NLS-'BraC」、「NES-LexAD-NFKBp65」、「NES-LexAD-cFos」では全てコロニーの形成が観察された。一方、核移行能のない「NES-LexAD-'BraC」、「NES-LexAD-CaMKK」ではコロニーの形成が完全に抑制された。これらの結

果は、「pNS」ベクターを用いた系が核移行能を持ったcDNA断片を特異的に検出可能であることを実証するものである。

産業上の利用可能性

本発明により、レポーター遺伝子の発現を指標に、被検DNAがコードするペプチドが核移行能を有するか否かを簡便に検出することが可能となった。また、レポーター遺伝子の発現を指標に、核移行能を有するタンパク質をコードするDNAを高速、高効率で網羅的にクローニングすることが可能となった。本発明によれば、生物学的に重要な機能を有する新規の核内タンパク質をコードするDNAの取得が著しく促進されるだけでなく、核内タンパク質の機能を研究する上で非常に有用な遺伝子発現情報（時期、場所、発現頻度など）を提供することができる。さらに、これらの情報の利用により、画期的な医薬品の開発に貢献することが大いに期待される。

配列表

- (1) 出願人の氏名又は名称： 株式会社ヘリックス研究所
- (2) 発明の名称： 核移行タンパク質の検出および単離方法
- (3) 整理番号： H 1 - 8 0 4 D P 1 P C T
- (4) 出願番号：
- (5) 出願日：
- (6) 優先権のもととなった出願をした国名及び出願の番号
- 日本国 平成 9 年特許願第 1 2 4 7 9 5 号
- 日本国 平成 9 年特許願第 3 0 9 6 8 6 号
- (7) 優先日： 1 9 9 8 年 4 月 2 8 日
- 1 9 9 8 年 1 0 月 2 4 日
- (6) 配列の数： 2 6

配列番号:1

配列の長さ:30

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

TTTGAATTCC CCAATTTTAA TCAAAGTGGG

30

配列番号:2

配列の長さ:32

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

TAGCATCTAT GACTTTTTGG GCGTTCAAG TG

32

配列番号:3

配列の長さ:342

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号:domain

存在位置:1..342

特徴を決定した方法:S

配列

GCC AAT TTT AAT CAA AGT GGG AAT ATT GCT GAT AGC TCA TTG TCC TTC 48

Ala Asn Phe Asn Gln Ser Gly Asn Ile Ala Asp Ser Ser Leu Ser Phe

1 5 10 15

ACT TTC ACT AAC AGT AGC AAC GGT CCG AAC CTC ATA ACA ACT CAA ACA 96

Thr Phe Thr Asn Ser Ser Asn Gly Pro Asn Leu Ile Thr Thr Gln Thr

20 25 30

AAT TCT CAA GCG CTT TCA CAA CCA ATT GCC TCC TCT AAC GTT CAT GAT 144

Asn Ser Gln Ala Leu Ser Gln Pro Ile Ala Ser Ser Asn Val His Asp

35 40 45

```

AAC TTC ATG AAT AAT GAA ATC ACG GCT AGT AAA ATT GAT GAT GGT AAT      192
Asn Phe Met Asn Asn Glu Ile Thr Ala Ser Lys Ile Asp Asp Gly Asn
      50              55              60

AAT TCA AAA CCA CTG TCA CCT GGT TGG ACG GAC CAA ACT GCG TAT AAC      240
Asn Ser Lys Pro Leu Ser Pro Gly Trp Thr Asp Gln Thr Ala Tyr Asn
65              70              75              80

GCG TTT GGA ATC ACT ACA GGG ATG TTT AAT ACC ACT ACA ATG GAT GAT      288
Ala Phe Gly Ile Thr Thr Gly Met Phe Asn Thr Thr Thr Met Asp Asp
      85              90              95

GTA TAT AAC TAT CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CCA AAC CCA AAA      336
Val Tyr Asn Tyr Leu Phe Asp Asp Glu Asp Thr Pro Pro Asn Pro Lys
      100             105             110

AAA GAG      342
Lys Glu

```

配列番号:4

配列の長さ :609

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 1 .. 606

特徴を決定した方法 : S

配列

ATG AAA GCG TTA ACG GCC AGG CAA CAA GAG GTG TTT GAT CTC ATC CGT	48
Met Lys Ala Leu Thr Ala Arg Gln Gln Glu Val Phe Asp Leu Ile Arg	
1 5 10 15	
GAT CAC ATC AGC CAG ACA GGT ATG CCG CCG ACG CGT GCG GAA ATC GCG	96
Asp His Ile Ser Gln Thr Gly Met Pro Pro Thr Arg Ala Glu Ile Ala	
20 25 30	
CAG CGT TTG GGG TTC CGT TCC CCA AAC GCG GCT GAA GAA CAT CTG AAG	144
Gln Arg Leu Gly Phe Arg Ser Pro Asn Ala Ala Glu Glu His Leu Lys	
35 40 45	
GCG CTG GCA CGC AAA GGC GTT ATT GAA ATT GTT TCC GGC GCA TCA CGC	192
Ala Leu Ala Arg Lys Gly Val Ile Glu Ile Val Ser Gly Ala Ser Arg	
50 55 60	
GGG ATT CGT CTG TTG CAG GAA GAG GAA GAA GGG TTG CCG CTG GTA GGT	240
Gly Ile Arg Leu Leu Gln Glu Glu Glu Gly Leu Pro Leu Val Gly	
65 70 75 80	
CGT GTG GCT GCC GGT GAA CCA CTT CTG GCG CAA CAG CAT ATT GAA GGT	288
Arg Val Ala Ala Gly Glu Pro Leu Leu Ala Gln Gln His Ile Glu Gly	
85 90 95	
CAT TAT CAG GTC GAT CCT TCC TTA TTC AAG CCG AAT GCT GAT TTC CTG	336
His Tyr Gln Val Asp Pro Ser Leu Phe Lys Pro Asn Ala Asp Phe Leu	
100 105 110	
CTG CGC GTC AGC GGG ATG TCG ATG AAA GAT ATC GGC ATT ATG GAT GGT	384
Leu Arg Val Ser Gly Met Ser Met Lys Asp Ile Gly Ile Met Asp Gly	
115 120 125	
GAC TTG CTG GCA GTG CAT AAA ACT CAG GAT GTA CGT AAC GGT CAG GTC	432
Asp Leu Leu Ala Val His Lys Thr Gln Asp Val Arg Asn Gly Gln Val	

130	135	140	
GTT GTC GCA CGT ATT GAT GAC GAA GTT ACC GTT AAG CGC CTG AAA AAA			480
Val Val Ala Arg Ile Asp Asp Glu Val Thr Val Lys Arg Leu Lys Lys			
145	150	155	160
CAG GGC AAT AAA GTC GAA CTG TTG CCA GAA AAT AGC GAG TTT AAA CCA			528
Gln Gly Asn Lys Val Glu Leu Leu Pro Glu Asn Ser Glu Phe Lys Pro			
	165	170	175
ATT GTC GTT GAC CTT CGT CAG CAG AGC TTC ACC ATT GAA GGG CTG GCG			576
Ile Val Val Asp Leu Arg Gln Gln Ser Phe Thr Ile Glu Gly Leu Ala			
	180	185	190
GTT GGG GTT ATT CGC AAC GGC GAC TGG CTG TAA			609
Val Gly Val Ile Arg Asn Gly Asp Trp Leu			
195	200		

配列番号:5

配列の長さ:10

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列

Gln Leu Pro Pro Leu Glu Arg Leu Thr Leu

1

5

10

配列番号:6

配列の長さ:30

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

ACAGCTGCCA CCGATTGAGA GACTTACGTT

30

配列番号:7

配列の長さ:30

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

TGTCGACGGT GGCTAACTCT CTGAATGCAA

30

配列番号:8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 1 .. 1077

特徴を決定した方法 : E

配 列

ATG AAA GCG TTA CAG CTG CCA CCG ATT GAG AGA CTT ACG TTA ACG GCC

48

Met Lys Ala Leu Gln Leu Pro Pro Ile Glu Arg Leu Thr Leu Thr Ala
 1 5 10 15
 AGG CAA CAA GAG GTG TTT GAT CTC ATC CGT GAT CAC ATC AGC CAG ACA 96
 Arg Gln Gln Glu Val Phe Asp Leu Ile Arg Asp His Ile Ser Gln Thr
 20 25 30
 GGT ATG CCG CCG ACG CGT GCG GAA ATC GCG CAG CGT TTG GGG TTC CGT 144
 Gly Met Pro Pro Thr Arg Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Gly Phe Arg
 35 40 45
 TCC CCA AAC GCG GCT GAA GAA CAT CTG AAG GCG CTG GCA CGC AAA GGC 192
 Ser Pro Asn Ala Ala Glu Glu His Leu Lys Ala Leu Ala Arg Lys Gly
 50 55 60
 GTT ATT GAA ATT GTT TCC GGC GCA TCA CGC GGG ATT CGT CTG TTG CAG 240
 Val Ile Glu Ile Val Ser Gly Ala Ser Arg Gly Ile Arg Leu Leu Gln
 65 70 75 80
 GAA GAG GAA GAA GGG TTG CCG CTG GTA GGT CGT GTG GCT GCC GGT GAA 288
 Glu Glu Glu Glu Gly Leu Pro Leu Val Gly Arg Val Ala Ala Gly Glu
 85 90 95
 CCA CTT CTG GCG CAA CAG CAT ATT GAA GGT CAT TAT CAG GTC GAT CCT 336
 Pro Leu Leu Ala Gln Gln His Ile Glu Gly His Tyr Gln Val Asp Pro
 100 105 110
 TCC TTA TTC AAG CCG AAT GCT GAT TTC CTG CTG CGC GTC AGC GGG ATG 384
 Ser Leu Phe Lys Pro Asn Ala Asp Phe Leu Leu Arg Val Ser Gly Met
 115 120 125
 TCG ATG AAA GAT ATC GGC ATT ATG GAT GGT GAC TTG CTG GCA GTG CAT 432
 Ser Met Lys Asp Ile Gly Ile Met Asp Gly Asp Leu Leu Ala Val His
 130 135 140

AAA ACT CAG GAT GTA CGT AAC GGT CAG GTC GTT GTC GCA CGT ATT GAT	480
Lys Thr Gln Asp Val Arg Asn Gly Gln Val Val Val Ala Arg Ile Asp	
145 150 155 160	
GAC GAA GTT ACC GTT AAG CGC CTG AAA AAA CAG GGC AAT AAA GTC GAA	528
Asp Glu Val Thr Val Lys Arg Leu Lys Lys Gln Gly Asn Lys Val Glu	
165 170 175	
CTG TTG CCA GAA AAT AGC GAG TTT AAA CCA ATT GTC GTT GAC CTT CGT	576
Leu Leu Pro Glu Asn Ser Glu Phe Lys Pro Ile Val Val Asp Leu Arg	
180 185 190	
CAG CAG AGC TTC ACC ATT GAA GGG CTG GCG GTT GGG GTT ATT CGC AAC	624
Gln Gln Ser Phe Thr Ile Glu Gly Leu Ala Val Gly Val Ile Arg Asn	
195 200 205	
GGC GAC TGG CTG GAA TTC GCC AAT TTT AAT CAA AGT GGG AAT ATT GCT	672
Gly Asp Trp Leu Glu Phe Ala Asn Phe Asn Gln Ser Gly Asn Ile Ala	
210 215 220	
GAT AGC TCA TTG TCC TTC ACT TTC ACT AAC AGT AGC AAC GGT CCG AAC	720
Asp Ser Ser Leu Ser Phe Thr Phe Thr Asn Ser Ser Asn Gly Pro Asn	
225 230 235 240	
CTC ATA ACA ACT CAA ACA AAT TCT CAA GCG CTT TCA CAA CCA ATT GCC	768
Leu Ile Thr Thr Gln Thr Asn Ser Gln Ala Leu Ser Gln Pro Ile Ala	
245 250 255	
TCC TCT AAC GTT CAT GAT AAC TTC ATG AAT AAT GAA ATC ACG GCT AGT	816
Ser Ser Asn Val His Asp Asn Phe Met Asn Asn Glu Ile Thr Ala Ser	
260 265 270	
AAA ATT GAT GAT GGT AAT AAT TCA AAA CCA CTG TCA CCT GGT TGG ACG	864
Lys Ile Asp Asp Gly Asn Asn Ser Lys Pro Leu Ser Pro Gly Trp Thr	

275	280	285	
GAC CAA ACT GCG TAT AAC GCG TTT GGA ATC ACT ACA GGG ATG TTT AAT			912
Asp Gln Thr Ala Tyr Asn Ala Phe Gly Ile Thr Thr Gly Met Phe Asn			
290	295	300	
ACC ACT ACA ATG GAT GAT GTA TAT AAC TAT CTA TTC GAT GAT GAA GAT			960
Thr Thr Thr Met Asp Asp Val Tyr Asn Tyr Leu Phe Asp Asp Glu Asp			
305	310	315	320
ACC CCA CCA AAC CCA AAA AAA GAG ATC TCT ATG GCT TAC CCA TAC GAT			1008
Thr Pro Pro Asn Pro Lys Lys Glu Ile Ser Met Ala Tyr Pro Tyr Asp			
325	330	335	
GTT CCA GAT TAC GCT AGC TTG GGT GGT CAT ATG GCC ATG GCG GCC GCT			1056
Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Gly His Met Ala Met Ala Ala Ala			
340	345	350	
CGA GTC GAC CTG CAG CCA AGC TAA			1080
Arg Val Asp Leu Gln Pro Ser			
355			

配列番号:9

配列の長さ : 1152

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 1 .. 1149

特徴を決定した方法 : S

配 列

ATG GCT AAG ATC TCT CCC GGG CTC GAG CTC ATG AAG AAG GGT ACT CAG	48
Met Ala Lys Ile Ser Pro Gly Leu Glu Leu Met Lys Lys Gly Thr Gln	
1 5 10 15	
CGT CTA TCC CGC CTG TTC GCC GCG ATG GCC ATT GCC GGG TTC GCC AGC	96
Arg Leu Ser Arg Leu Phe Ala Ala Met Ala Ile Ala Gly Phe Ala Ser	
20 25 30	
TAC TCC ATG GCC GCC GAC ACC ATC AAG ATC GCC CTG GCT GGC CCG GTC	144
Tyr Ser Met Ala Ala Asp Thr Ile Lys Ile Ala Leu Ala Gly Pro Val	
35 40 45	
ACC GGT CCG GTA GCC CAG TAC GGC GAC ATG CAG CGC GCC GGT GCG CTG	192
Thr Gly Pro Val Ala Gln Tyr Gly Asp Met Gln Arg Ala Gly Ala Leu	
50 55 60	
ATG GCA ATC GAA CAG ATC AAC AAG GCA GGC GGC GTG AAC GGC GCG CAA	240
Met Ala Ile Glu Gln Ile Asn Lys Ala Gly Gly Val Asn Gly Ala Gln	
65 70 75 80	
CTC GAA GGC GTG ATC TAC GAC GAC GCC TGC GAT CCC AAG CAG GCC GTG	288
Leu Glu Gly Val Ile Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val	
85 90 95	
GCG GTC GCC AAC AAG GTG GTC AAC GAC GGC GTC AAG TTC GTG GTC GGT	336
Ala Val Ala Asn Lys Val Val Asn Asp Gly Val Lys Phe Val Val Gly	
100 105 110	
CAT GTC TGC TCC AGC TCC ACC CAA CCC GCC ACC GAC ATC TAC GAA GAC	384
His Val Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Thr Asp Ile Tyr Glu Asp	
115 120 125	

GAA GGC GTG CTG ATG ATC ACC CCG TCG GCC ACC GCC CCG GAA ATC ACC	432
Glu Gly Val Leu Met Ile Thr Pro Ser Ala Thr Ala Pro Glu Ile Thr	
130 135 140	
TCG CGC GGC TAC AAG CTG ATC TTC CGC ACC ATC GGC CTG GAC AAC ATG	480
Ser Arg Gly Tyr Lys Leu Ile Phe Arg Thr Ile Gly Leu Asp Asn Met	
145 150 155 160	
CAG GGC CCG GTG GCC GGC AAG TTC ATC GCC GAA CGC TAC AAG GAC AAG	528
Gln Gly Pro Val Ala Gly Lys Phe Ile Ala Glu Arg Tyr Lys Asp Lys	
165 170 175	
ACC ATC GCG GTA CTG CAC GAC AAG CAG CAG TAC GGC GAA GGC ATC GCC	576
Thr Ile Ala Val Leu His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Ile Ala	
180 185 190	
ACC GAG GTG AAG AAG ACC GTG GAA GAC GCC GGC ATC AAG GTT GCC GTC	624
Thr Glu Val Lys Lys Thr Val Glu Asp Ala Gly Ile Lys Val Ala Val	
195 200 205	
TTC GAA GGC CTG AAC GCC GGC GAC AAG GAC TTC AAC GCG CTG ATC AGC	672
Phe Glu Gly Leu Asn Ala Gly Asp Lys Asp Phe Asn Ala Leu Ile Ser	
210 215 220	
AAG CTG AAG AAA GCC GGC GTG CAG TTC GTC TAC TTC GGC GGC TAC CAC	720
Lys Leu Lys Lys Ala Gly Val Gln Phe Val Tyr Phe Gly Gly Tyr His	
225 230 235 240	
CCA GAA ATG GGC CTG CTG CTG CGC CAG GCC AAG CAG GCC GGG CTG GAC	768
Pro Glu Met Gly Leu Leu Leu Arg Gln Ala Lys Gln Ala Gly Leu Asp	
245 250 255	
GCG CGC TTC ATG GGC CCG GAA GGG GTC GGC AAC AGC GAA ATC ACC GCG	816
Ala Arg Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ser Glu Ile Thr Ala	

260	265	270	
ATC GCC GGC GAC GCT TCG GAA GGC ATG CTG GCG ACC CTG CCG CGC GCC			864
Ile Ala Gly Asp Ala Ser Glu Gly Met Leu Ala Thr Leu Pro Arg Ala			
275	280	285	
TTC GAG CAG GAT CCG AAG AAC AAG GCC CTG ATC GAC GCC TTC AAG GCG			912
Phe Glu Gln Asp Pro Lys Asn Lys Ala Leu Ile Asp Ala Phe Lys Ala			
290	295	300	
AAG AAC CAG GAT CCG AGC GGC ATC TTC GTC CTG CCC GCC TAC TCC GCG			960
Lys Asn Gln Asp Pro Ser Gly Ile Phe Val Leu Pro Ala Tyr Ser Ala			
305	310	315	320
GTC ACA GTG ATC GCC AAG GGC ATC GAG AAA GCC GGC GAG GCC GAT CCG			1008
Val Thr Val Ile Ala Lys Gly Ile Glu Lys Ala Gly Glu Ala Asp Pro			
325	330	335	
GAG AAG GTC GCC GAG GCC CTG CGC GCC AAC ACC TTC GAG ACT CCC ACC			1056
Glu Lys Val Ala Glu Ala Leu Arg Ala Asn Thr Phe Glu Thr Pro Thr			
340	345	350	
GGG AAC CTC GGG TTC GAC GAG AAG GGC GAC CTG AAG AAC TTC GAC TTC			1104
Gly Asn Leu Gly Phe Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Asn Phe Asp Phe			
355	360	365	
ACC GTC TAC GAG TGG CAC AAG GAC GCC ACC CGG ACC GAG GTC AAG			1149
Thr Val Tyr Glu Trp His Lys Asp Ala Thr Arg Thr Glu Val Lys			
370	375	380	
TAA			1152

配列番号:10

配列の長さ:12

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列

Ser Glu Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Thr

1

5

10

配列番号:11

配列の長さ:37

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

CTAGCGAGCC TCCAAAAAG AAGAGAAAGG TCGAAAC

37

配列番号:12

配列の長さ:37

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

GCTCGGAGGT TTTTCTTCT CTTCCAGCT TTGGTAC

37

配列番号:13

配列の長さ:419

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:genomic DNA

配列

TCGACTGCTG TATATAAAAC CAGTGGTTAT ATGTACAGTA CTGCTGTATA TAAAACCAGT	60
GGTTATATGT ACAGTACGTC GAGGGAATCA AATTAACAAC CATAGGATGA TAATGCGATT	120
AGTTTTTTAG CCTTATTTCT GGGGTAATTA ATCAGCGAAG CGATGATTTT TGATCTATTA	180
ACAGATATAT AAATGCAAAA ACTGCATAAC CACTTTAACT AATACTTTCA ACATTTTCGG	240
TTTGTATTAC TTCTTATTCA AATGTAATAA AAGTATCAAC AAAAAATTGT TAATATACCT	300
CTATACTTTA ACGTCAAGGA GAAAAAACTA TAATGACTAA ATCTCATTCA GAAGAAGTGA	360
TTGTACCTGA GTTCAATTCT AGCGCAAAGG AATTACCAAG ACCATTGGCC GAAAAGTGC	419

配列番号:14

配列の長さ:12

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

AATTGACCAC CC	12
---------------	----

配列番号:15

配列の長さ:12

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

CTGGTGGGTT AA

12

配列番号:16

配列の長さ:25

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

CTAGCTTGGG TGGAATTCAT ATGGC

25

配列番号:17

配列の長さ:24

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

GAACCCACCT TAAGTATACG GTAC

24

配列番号:18

配列の長さ:11

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

CTGCATGCAC C

11

配列番号:19

配列の長さ:14

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

ATGGACGTAC GTGG

14

配列番号:20

配列の長さ:32

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

CTATTCGATG ATGAAGATAC CCCACCAAAC CC

32

配列番号:21

配列の長さ:30

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

GAAATTCGCC CGGAATTAGC TTGGCTGCAG

30

配列番号:22

配列の長さ:32

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

CTATTCGATG ATGAAGATAC CCCACCAAAC CC

32

配列番号:23

配列の長さ:30

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

GAAATTCGCC CGGAATTAGC TTGGCTGCAG

30

配列番号 : 24

配列の長さ : 32

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TTTCAATTGG AATGGACGAA CTGTTCCCC TC

32

配列番号 : 25

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCGCAGCGAG TCAGTGAGCG AGGAAGCGGA AGAGG

35

配列番号 : 26

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TTTGAATTCT AATGATGTTT TCGGGTTTCA ACGCG

35

請求の範囲

1. 核移行能を有しない転写因子をコードするDNAと被検DNAとの融合DNAを、該転写因子が結合した際に活性化されるプロモーター領域および該プロモーター領域の下流に連結したレポーター遺伝子を核内に保持する真核生物宿主に導入し、該レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする、被検DNAがコードするペプチドの核移行能の検出方法。
2. 核移行能を有しない転写因子が、核外移行シグナル、DNA結合ドメイン、および転写活性化ドメインを含む融合タンパク質である、請求項1に記載の方法。
3. 核移行能を有しない転写因子が、核外移行シグナル、LexAタンパク質、GAL4の転写活性化ドメインを含む融合タンパク質であり、該転写因子が結合した際に活性化されるプロモーター領域が、オペレーター配列をLexAのオペレーター配列に置換したGAL1遺伝子のプロモーター領域である、請求項1に記載の方法。
4. 核外移行シグナルが配列番号：5に記載のアミノ酸配列からなるペプチドである、請求項3に記載の方法。
5. レポーター遺伝子がLEU2および／または β -ガラクトシダーゼの遺伝子である、請求項1～4のいずれかに記載の方法。
6. 核移行能を有しない転写因子をコードするDNAと被検DNAとの融合DNAを、該転写因子が結合した際に活性化されるプロモーター領域および該プロモーター領域の下流に連結したレポーター遺伝子を核内に保持する真核生物宿主に導入し、該レポーター遺伝子の発現を検出し、発現が検出された真核生物宿主から被検DNAを単離することを特徴とする、核移行能を有するペプチドをコードするDNAの単離方法。
7. 核移行能を有しない転写因子が、核外移行シグナル、DNA結合ドメイン、および転写活性化ドメインを含む融合タンパク質である、請求項6に記載の方法。
8. 核移行能を有しない転写因子が、核外移行シグナル、LexAタンパク質、GA

L4の転写活性化ドメインを含む融合タンパク質であり、該転写因子が結合した際に活性化されるプロモーター領域が、オペレーター配列をLexAのオペレーター配列に置換したGAL1遺伝子のプロモーター領域である、請求項6に記載の方法。

9. 核外移行シグナルが配列番号：5に記載のアミノ酸配列からなるペプチドである、請求項8に記載の方法。

10. レポーター遺伝子がLEU2および／または β -ガラクトシダーゼの遺伝子である、請求項6～9のいずれかに記載の方法。

11. 核移行能を有しない転写因子をコードするDNAに隣接した被検DNAの導入部位を有するベクター。

12. 核移行能を有しない転写因子が、核外移行シグナル、DNA結合ドメイン、および転写活性化ドメインを含む融合タンパク質である、請求項11に記載のベクター。

13. 核移行能を有しない転写因子が、核外移行シグナル、LexAタンパク質、GAL4の転写活性化ドメインを含む融合タンパク質である、請求項11に記載のベクター。

14. 核外移行シグナルが配列番号：5に記載のアミノ酸配列からなるペプチドである、請求項13に記載のベクター。

15. ①核移行能を有しない転写因子をコードするDNAに隣接した被検DNAの導入部位を有するベクター、②該転写因子が結合した際に活性化されるプロモーター領域と該プロモーター領域の下流に連結したレポーター遺伝子とからなる発現ユニットを核内に保持する真核生物宿主、を含むキット。

16. 核移行能を有しない転写因子が、核外移行シグナル、DNA結合ドメイン、および転写活性化ドメインを含む融合タンパク質である、請求項15に記載のキット。

17. 核移行能を有しない転写因子が、核外移行シグナル、LexAタンパク質、GAL4の転写活性化ドメインを含む融合タンパク質であり、該転写因子が結合した

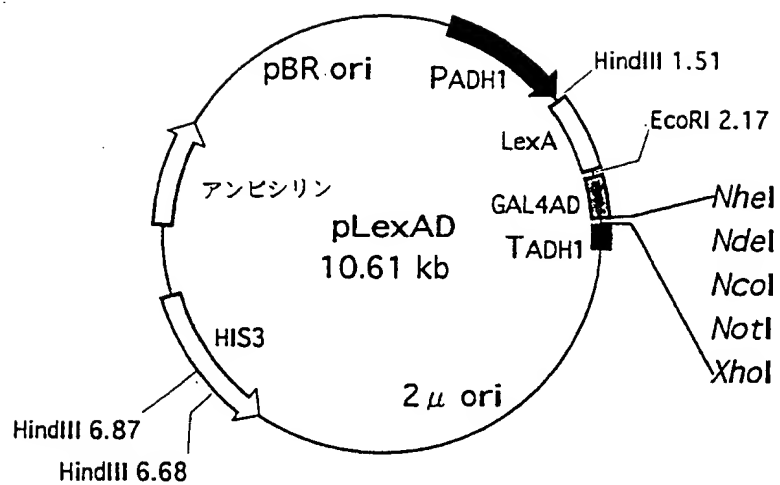
際に活性化されるプロモーター領域が、オペレーター配列をLexAのオペレーター配列に置換したGAL1遺伝子のプロモーター領域であり、真核生物宿主が酵母である、請求項15に記載のキット。

18. 核外移行シグナルが配列番号：5に記載のアミノ酸配列からなるペプチドである、請求項17に記載のキット。

19. レポーター遺伝子がLEU2および／または β -ガラクトシダーゼの遺伝子である、請求項15～18のいずれかに記載のキット。

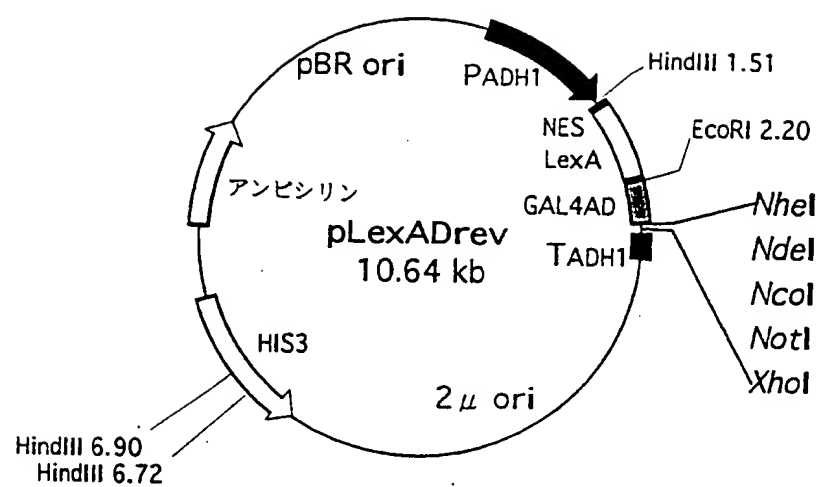
1 / 8

図 1



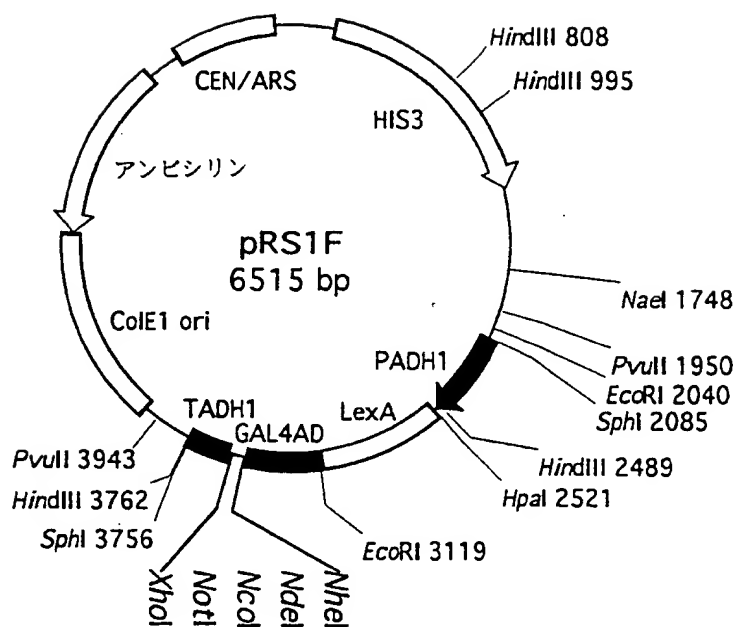
2 / 8

図 2



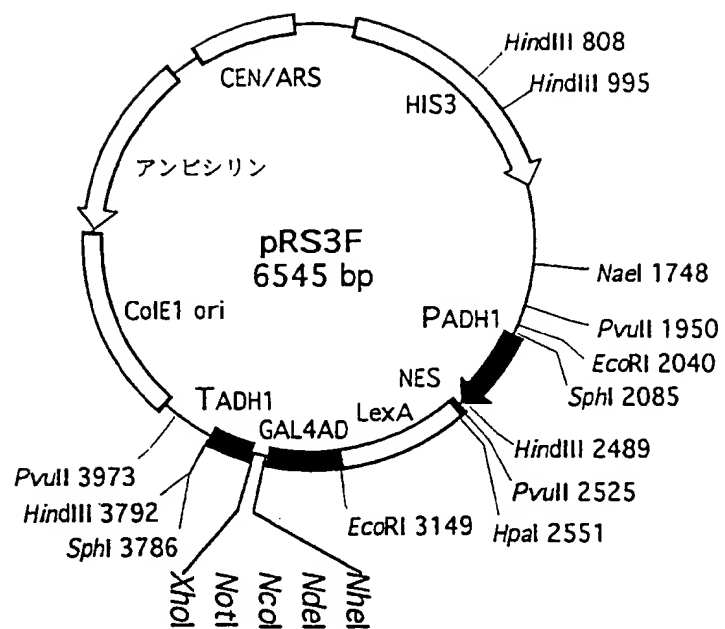
3 / 8

図 3



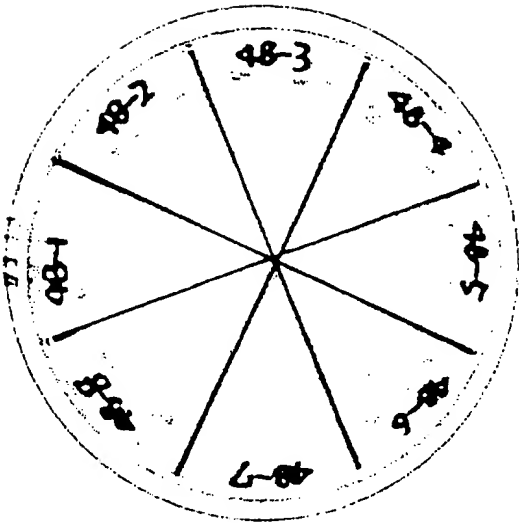
4 / 8

図 4

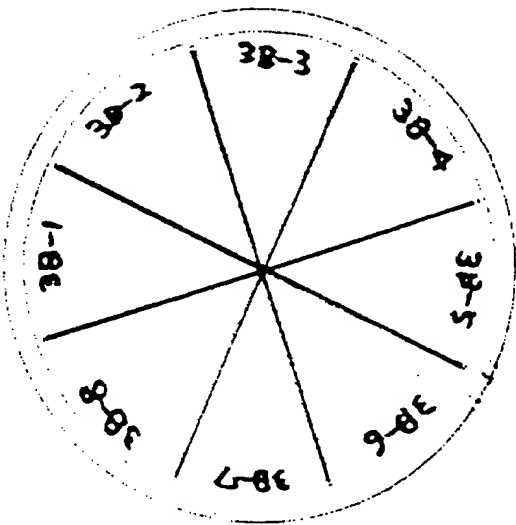


6

pRS3FN'BraC

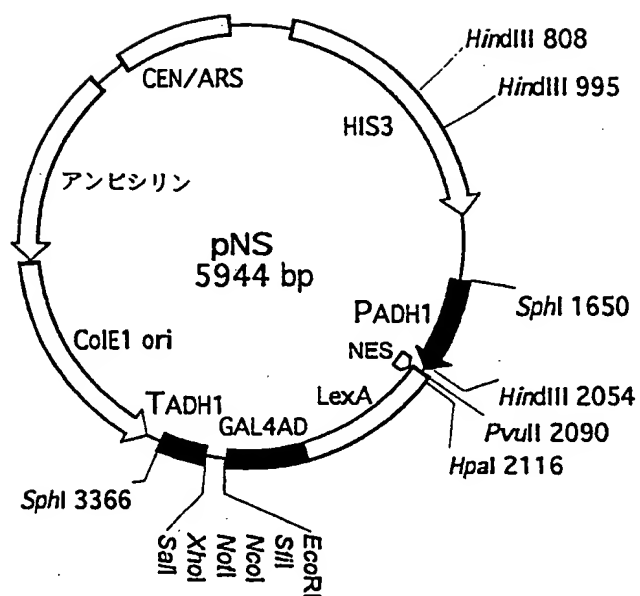


pRS3F'BraC

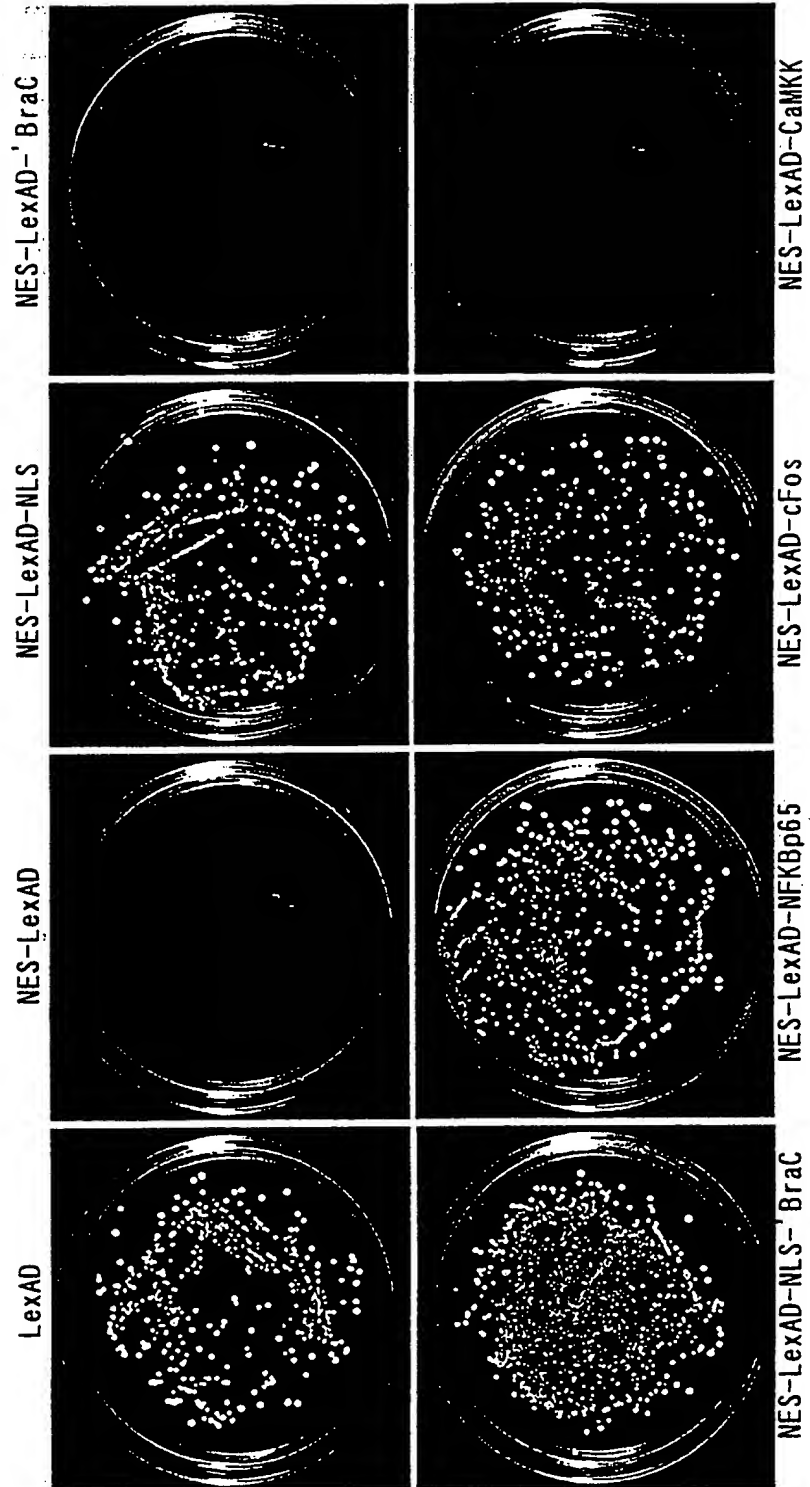


7 / 8

図 7



8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01936

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N15/09, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12N15/09, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PA	JP, 9-187283, A (Shionogi & Co., Ltd.), July 22, 1997 (22. 07. 97) (Family: none)	1-19
A	Cell, Vol. 82 (1995), Wei Wen et al., "Identification of a Signal for Rapid Export of Proteins from the Nucleus" p.463-473	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later than
the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority
date and not in conflict with the application but cited to understand
the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive step
when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such combination
being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
August 4, 1998 (04. 08. 98)

Date of mailing of the international search report
August 11, 1998 (11. 08. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁸ C12N 15/09, C12Q 1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁸ C12N 15/09, C12Q 1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	J P, 9-187283, A (塩野義製薬株式会社) 22. 7月. 1997 (22. 07. 97) (ファミリーなし)	1-19
A	Cell, Vol. 82 (1995), Wei Wen et al. "Identification of a Signal for Rapid Export of Proteins from the Nucleus" p. 463-473	1-19

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04. 08. 98

国際調査報告の発送日

11.08.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4 B

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3449